

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Gabriel Agur

**Meetod viirusnakkuse inhibiitorite leidmiseks ja kirjeldamiseks nanolutsiferaasi  
aktiivsusega viiruslaadsete partiklite abil**

Magistritöö

30 EAP

Juhendajad

Mart Ustav, PhD

Andres Männik, PhD

TARTU 2018

# Infoleht

Ebolaviiruse puhanguid on inimkonna ajaloos olnud mitmeid ning tegemist on väga ohtliku patogeeniga. Kuigi leevendavaid ravilahendusi on leitud, siis spetsiifiliste viirusvastaste ravimite arendamine on üsna algusjärgus. Seetõttu jätkuvad otsinguid efektiivsemate mooduste leidmiseks võitlemaks selle letaalse viiruse vastu. Spetsiifilised viirusvastased ravimid võivad inhibeerida viiruse elutsükli erinevaid etappe: rakku sisenemist, viiruse geneetilise materjali paljundamist, uute viirusosakeste väljutamist rakust. Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli luua uudne moodus viiruse rakku sisenemise inhibiitorite tuvastamiseks ja iseloomustamiseks, kasutades nanolutsiferaasi aktiivsusega mittepatoogeenseid viiruslaadseid partikleid. Pseudotüpeerides viiruslaadseid partikleid sobivate viiruseliste pinnavalkudega, mille seondumine on viiruse sisenemiseks vajalik, oleks sellist süsteemi põhimõtteliselt võimalik kasutada mitte ainult Ebola vaid ka mitmete teiste patogeensete viiruste (nt gripiviirus, HIV jm) vastaste inhibiitorite tuvastamiseks.

Märksõnad: Viiruslaadsed partiklid (VLP), nanolutsiferaas, Ebola

CERCS (B230): Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Ebola virus outbreaks have occurred multiple times in our society and remains to be a highly dangerous pathogen. Although there have been mitigating solutions to this problem, a conclusive vaccine or drug has not been produced or is in its infancy. Specific antiviral drugs can inhibit many stages of virus life cycle: cell invasion, replication of genetic material, budding from cells and so on. The aim of this thesis was to create a new method for identifying novel inhibitors for viral invasion by pseudotyping virus-like particles with different glycoproteins. This method would be useful for not only ebolavirus species but for many other pathogenic viruses like Influenza or HIV.

Key words: Virus-like particles (VLP), nanoluciferase, Ebola

CERCS (B230): Microbiology, bacteriology, virology, mycology

# SISUKORD

SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	6
SISSEJUHATUS .....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. Ebola viirus.....	8
1.1.1. Ebolaviiruse pinnavalk GP .....	9
1.1.2. Ebola viiruste infektsioonitsükkel .....	10
1.2. Viiruselaadsed partiklid (VLP).....	11
1.3. Viiruseid neutraliseerivad antikehad .....	13
1.4. Viirusnakkuste tuvastamisega seotud analüüsid .....	14
1.4.1. Elektronmikroskoopia meetod.....	15
1.4.2. Rakukultuuri meetod .....	15
1.4.3. Hemagglutiniini inhibitsiooni test .....	16
1.4.4. EIA/ELISA ( <i>Enzyme-linked immuno (sorbent) assay</i> ) .....	16
1.4.5. Viiruse genoomi amplifikatsiooni-põhised meetodid .....	16
1.4.6. Viiruslaadsetel partikkelitel põhinevad testid .....	17
1.5. Ebola VLP-d .....	17
1.5.1. Nanolutsiferaas ebolaviiruse VLP-de reporterina .....	18
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	20
2.1. Töö eesmärk .....	20
2.2. Materjal ja meetodika.....	21
2.2.1. Töös kasutatud eukariootsete rakkude tüved ja nende kasutamise eesmärk .....	21
2.2.2. DNA kloneerimine .....	21
2.2.2.1. Restriktsioon.....	21
2.2.2.2. DNA geelist puhastamine.....	22
2.2.2.3. Fragmentide ligeerimine.....	22
2.2.2.4. Transformatsioon.....	22
2.2.2.5. Plasmiidse DNA puhastamine .....	23
2.2.3. VLP-de tootmine .....	24

2.2.4. VLP-de puhastamine .....	24
2.2.5. Valgukonstsentratsioonide hindamine (BCA).....	25
2.2.6. Rakkude nakatamine VLP-dega .....	25
2.2.7. Nakatumise efektiivsuse mõõtmine Luminestsentsi kaudu.....	25
2.2.8. Western blot.....	26
2.2.9. Coomassie värvimine .....	27
2.3. Tulemused ja arutelu .....	28
2.3.1. VLP tootmisvektorite arendamine, kasutades Icosagen QMCF tehnoloogiat.....	28
2.3.1.1. Tootmisvektori pQMCF nanolucVP40 GP valmistamine.....	28
2.3.1.2. Pinnavalguta VLP-de ekspressioonivektori valmistamine .....	31
2.3.1.3. HIV-1 pinnavalku eksponeeriva VLP ekspressioonivektori valmistamine.....	32
2.3.1.4. Linnugripi H5 pinnavalku eksponeeriva VLP ekspressioonivektori valmistamine.....	34
2.3.2. Pseudotüpeeritud VLP-de tootmine imetajarakkudes .....	36
2.3.3. Pinnavalkude sisalduse määramine VLP fraktsioonides .....	37
2.3.4. Puhastatud VLP-de lutsiferaasi aktiivsuse määramine.....	39
2.3.5. Edasiseks testimiseks valitud VLP-de kvaliteedi kontroll .....	40
2.3.6. Toodetud VLP-de sihtmärkrakkudesse sisenemise ja selle tuvastamise testimine ....	42
2.3.6.1. Esimene nakatamise test: VLP kontsentratsiooni ja seerumi mõju testimine .....	43
2.3.6.2. Teine nakatamise test: Vero E6 rakkude kasutamine ebola GP vahendatud sisenemise mõõtmiseks .....	47
2.3.6.3. Kolmas test: mittespetsiifiline kleepumine vs. rakku sisenemine .....	49
2.3.6.4. Neljas nakatamise test: uus partii VLP-sid.....	51
KOKKUVÕTE .....	53
SUMMARY .....	54
KIRJANDUSE LOETELU.....	55
KASUTATUD VEEBILEHED.....	60
LISAD .....	61
Lisa 1. pQMCF-nanolucVP40-GP #2 plasmidi kontroll restriksioonanalüüsiga.....	61
Lisa 2. pQMCF-nLucVP40-GP' #4 plasmidi kontroll restriksioonanalüüsiga.....	62
Lisa 3. pQMCF-nLucVP40-ConBtrev plasmidi kontroll restriksioonanalüüsiga.....	63
Lisa 4. pQMCF-nLucVP40-HA5 plasmidi kontroll restriksioonanalüüsiga.....	64

LIHTLITSENTS.....	65
-------------------	----

## KASUTATUD LÜHENDID

bNAB – laialdaselt neutraliseeriv antikeha (*broadly neutralizing antibody*)

BSL-4 – Bio-ohutuse tase 4 (*biosafety level 4*)

Km – Kanamütsiin

LB – kasvusööde (*lysogeny broth*)

Nanoluc – Nanolutsiferaas (*nanoluciferase*)

PenStrep – Penitsilliin + Streptomütsiin

RLU – Relatiivne valguse ühik (*Relative light units*)

RNP – Ribonukleovalk (*Ribonucloe protein*)

ssRNA – üheaheelaline RNA (*single-strand RNA*)

VLP – Viiruselaadne partikkel (*virus-like particle*)

WHO - Maailma Terviseorganisatsioon (*World Health Organization*)

# SISSEJUHATUS

Ebolaviiruse puhangud on olnud suureks meditsiiniliseks probleemiks maailmas. Kuigi viimasel ajal on viiruse levik vaibunud siis on jätkuvalt tegemist väga patogeense viirusega, millele lõpliku ravimit või vaktsiini leitud pole.

Kuna ohtlike viirustega töötamine on sageli keeruline ning kallis, siis on vajadus leida mugavamaid analüüsisüsteeme nende uurimiseks. Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli luua uudne testsüsteem, millega saab testida viiruse rakku sisenemist inhibeerivate ainete, näiteks pinnavalkude vastaste neutraliseerivate antikehade, viirusvastast aktiivsust. Testsüsteemi oli plaanis esmalt valideerida, kasutades Icosagenis arendatud ebolaviiruste pinnavalgu vastaste antikehade paneeli.

Testsüsteemi aluseks on viiruse mimikeerimine viiruse pinnavalku eksponeerivate pseudotüpeeritud viiruselaadsete partiklitega (VLP-dega), millel on lisatud lutsiferaasne aktiivsus (lutsiferaas NanoLuc) (Hall jt., 2012). Kui VLP-d omavad nakatamiseks vajaliku pinnavalku, saab toimuda VLP rakku sisenemine sarnaselt autentsele viirusele ning rakku sisenemise efektiivsus oleks mõõdetav nakatunud rakus tekkiva lutsiferaasi aktiivsusega. Sellise signaali tugevus korreleeruks sisenenud VLP-d hulgaga. Sisenemise inhibeerimine (näiteks antikehaga) tooks aga kaasa vastupidise efekti, kus lutsiferaasi madalam signaal annaks kvantiseeritavat informatsiooni inhibiitori efektiivsuse kohta.

Viiruslaadsete partiklite kasutamisel on suur eelis autentsete viiruste ees. Kuna paljunemiseks vajaliku genoomset materjali VLP-del ei ole, on elimineeritud ka nakkusoht ning on võimalik uurida patogeensete viiruste nakkusega seotud mehhanisme tavalaborites. Käesolevas töös keskendutakse peamiselt selliste viirulaadsete partiklite tootmiseks vajalike tootmisevektorite koostamisele, VLP-de tootmisele ning nende lutsiferaasse aktiivsuse mõõtmisele eukarüootsete rakkude nakatamisel.

Uudse testsüsteemi väljatöötamine toimus ettevõttes Icosagen AS.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Ebola viirus

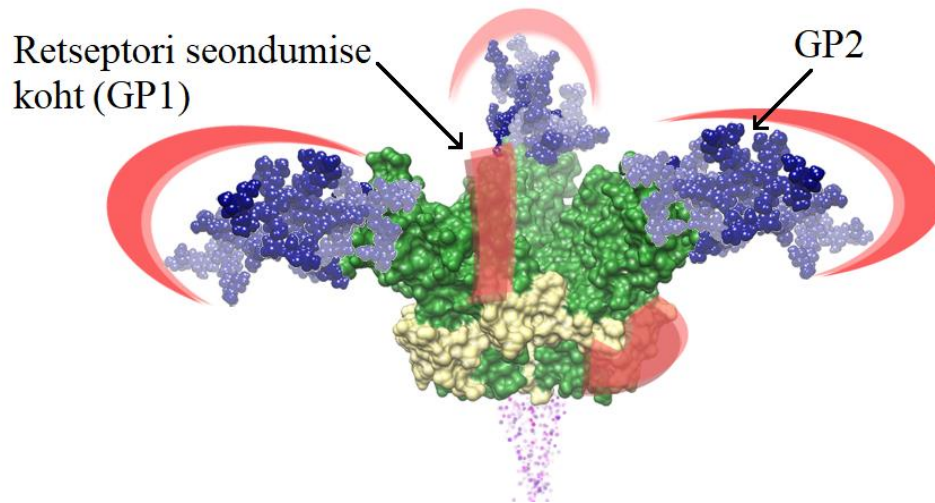
Ebolaviirused (EBOV) kuuluvad Filoviiruste perekonda, mis põhjustavad nakatunud inimestel ohtlikku viiruslikku hemorraagilist palavikku, mis võib lõppeda surmaga (Martinez jt., 2010). WHO (*World Health Organization*) andmetel on ajavahemikus 2015 - 2016 ebolaviiruse puhangutes nakatunud ligi 28 000 ning surnud 11 000 inimest ning seda viirust tohib paljundada vaid bio-ohutuse taseme 4 laborites (BSL-4 – *Biosafety level 4*). Erinevaid ebolaviiruseid on kokku viis: *Zaire*-, *Sudan*-, *Bundibugyo*-, *Tai Forest*-, ja *Reston* ebolaviirus. Esimesed kolm on olnud ebolaviiruste puhangute põhjuseks mitmeid kordi ning nende puhul on haigestunute suremust hinnatud 40-90%. (Ebola outbreak, kuupäev puudub; Ebola virus..., 2018)

Ebolaviirus on negatiivse üheaahelalise RNA genoomiga viirus, mille pikkuseks on umbes 19 kb ning see kodeerib seitset struktuurset valku (NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24 ja L) (Joonis 1) (Nanbo jt., 2013). NP (*nucleoprotein*), ehk nukleovalk on ühenduses viiruse genoomiga ning see moodustab koos polümeraasi kofaktori VP35, transkriptsiooni aktivaatori VP30 ja RNA sõltuva RNA polümeraasiga L nukleokapsiidi NC (*nucleocapsid*) (Becker jt., 1998). Nukleokapsiidi eesmärk on katalüüsida rakku sisenenud viiruse genoomi replikatsiooni ja transkriptsiooni (Mühlberger jt., 1999). Väike maatriksivalk VP24 on vajalik nukleokapsiidi kokkupanekuks ja stabiilsuse tagamiseks ning VP40 maatriksivalgu eesmärk on filamentsete viiruslaadsete partiklite moodustamine ning rakust pungumine (Nanbo jt., 2013). GP (glycoprotein) on pinnavalk, mis tagab retseptor-vahendatud ühinemise sihtmärk-rakuga ning sisenemise rakku (Feldmann jt., 1999, Lee jt., 2008, Nanbo jt., 2010).





TM (*trans-membrane*) ja tsütoplasmaatilise saba piirkonda, mis on vajalik membraanide kokku sulamiseks raku sisenemisel. GP pinnavalk on suures ulatuses kaetud oligosahhariididega, maskeerides antikeha seondumiseks vajalikku epitoopi. Sekreteeritavad *shed* GP ja sGP on arvatud peibutis-valkudeks, võttes enda peale antikehade seondumise immuunreaktsioonil. See on üheks põhjuseks, mis muudab ebolaviirust neutraliseeriva antikehavastuse saavutamise keerulisemaks. (Cook ja Lee, 2013, Ning jt., 2017)



**Joonis 2.** Ebolaviiruse pinnavalk GP<sub>1,2</sub> retseptori seondumiskoha GP1- ja GP2 domeeniga, mis moodustavad heterodimeeride trimeeri. (Cook ja Lee, 2013) Autori kohandused.

### 1.1.2. Ebola viiruste infektsioonitsükkel

Ebolaviiruse infektsioon algab läbi otsese kontakti nakatunud inimese või looma (nt gorillad, šimpansid, nahkhiired) kehavedelike kaudu (Feldmann jt., 2003). Sellele järgneb viiruse GP1 valgu retseptori seondumise domeeni interaktsioon raku retseptori(te)ga ning GP2 valgu vahendatud membraanide kokku sulamine (Yu jt., 2017). Kuigi on mitmeid arvamusi, kuidas viirus täpselt rakku siseneb, siis üheks tõenäolisemaks viisiks on makropinotsütoos (Nanbo jt., 2010). Rakku sisenenud viirus koos valkudega vabastatakse endosoomist GP2 trimeersete heptaadi korduste ja valgu NPC1 (Niemann-Pick C1) abil tsütoplasmasse (Malashkevich jt., 1999, Carette jt., 2011). Nagu teistegi ssRNA (*single-strand RNA*) viiruste puhul, on ebolaviiruse genoom pakitud nukleokapsiidi, moodustades ribonukleoalgu kompleksi RNP (*ribonucleoprotein*) koos RNA-sõltuva RNA polümeraasiga (Bamberg jt., 2005). RNP vabastatakse virionist ning on

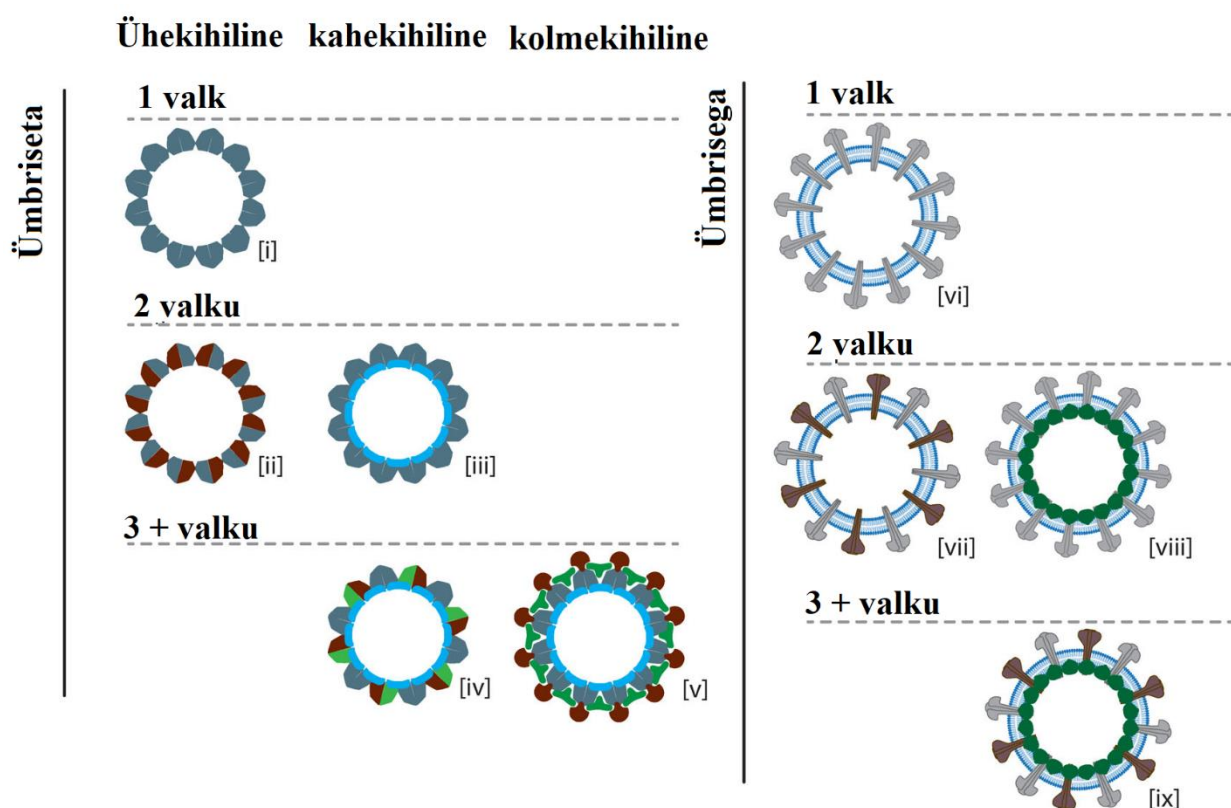
matriitsiks komplementaarse positiivse RNA moodustamiseks, mille pealt valmistatakse raku mehhanismide abil kõik viiruse valgud ning uued täispikkuses negatiivse ahelaga RNA genoomid. Viiruse osakeste kokku pakkimine algab nukleokapsiidi moodustamisega tuuma lähedal, mis transporditakse edasi pungumis-kohtadesse. Läbi erinevate sekretsiooniradade toimetatakse plasmamembraani juurde ka GP, VP40, VP24 ning NP valgud. Plasmamembraani sisse toimetatud GP ja VP40 on ümbriseks RNP kompleksile, läbi mille virion välja pungub. (Yu jt., 2017)

## 1.2. Viiruselaadsed partiklid (VLP)

Viiruselaadsed partiklid ehk VLP-d (ingl. K. *Virus-like particle*) on valguliste subühikute kompleks, mis on morfoloogiliselt identne või väga sarnane neile vastava autentse viirusega. Terminit „VLP“ kasutatakse ka teiste bioloogiliste moodustiste kohta, mida leitakse bioloogilistes uuringutes ning millel on viiruselaadne morfoloogia. Viimase kolmekümne aasta jooksul on VLP-de kasutamine muutunud biotehnoloogias laialdaselt aktsepteeritud vahendiks, näiteks kasutamisel viirusvastaste vaktsiinidena. Tõhusad viirusvastased vaktsiinid on sageli nõrgendatud või keemiliselt inaktiveeritud elus viirused. Seega on olemas risk, et võib ebapiisav viiruse inaktivatsioon või nõrgendatud viiruse tagasipöördumine viia haiguse tekkeni vaktsineeritud patsiendis. Need ohud on suuremad viiruste puhul, mille genoom on segmenteeritud. Sellistel puhkudel võib viiruse genoom ennast rekombineerida ning tulemuseks on täiesti uus viiruse tüvi, mis võib osutuda virulentseks (Noad ja Roy, 2003) Seetõttu on VLP-d vaktsiiniuuringutel väga tähtsal kohal. Samuti kasutatakse ka VLP-sid uute nanomaterjalide tootmiseks, geeniteraapiate läbiviimiseks ning viiruste bioloogiliste protsesside, näiteks viiruste kokkupakkumise ja nende struktuuride uurimiseks. (Zeltins, 2013) Paljulubav on ka VLP põhine sihipärane ravimi kohaletoimetamise meetod, kus nanopartiklite (VLP-de) abil toimetatakse toksiline ravim ainult defektsete rakkudeni (Rohovie jt., 2017).

Esimene rekombinantne VLP sünteesiti B Hepatiidi kattevalgu HbcAg ja tubaka mosaiigiviiruse (TMV) geenide abil, mis andis hoogu juurde VLP-de uurimisse (Valenzuela jt., 1982, Haynes jt., 1986). Tänapäevaks on kirjeldatud üle 100 erineva VLP, mis pärinevad nii mikroobide-, taimede-, putukate- ja imetajate viirustest (Zeltins, 2013).

Struktuuri põhjal võib VLP-d jaotada kaheks tüübiks: ümbrisega ja ilma ümbriseta. Ümbriseta VLP-d jaotatakse omakorda ühe- või mitme kapsiidiga VLP-deks, vastavalt sellele, mitu valku läheb vaja VLP moodustumiseks. Ümbrisega VLP koosneb üldiselt viirusvalgu moodustatud kapsiidist, millele lisandub peremeesraku lipiidne rakumembraan (omandatakse rakust väljumisel) ning sellega seotud viiruse maatriksivalgud ning glükoproteiinid. (Joonis 3) (Lua jt., 2014) VLP-de moodustumine võib aga toimuda erinevalt tavalistest viirustest nii rakkude sees, kui ka rakuvabas keskkonnas. Rakuvabas keskkonnas võivad küll moodustuda ainult lihtsamad ümbriseta VLP-d, näiteks ühekihilise kapsiidiga VLP (Chen jt., 2001). Sageli vajab VLP-de tootmine kompleksemaid süsteeme, näiteks kasutatakse nende tootmiseks eukarüootseid rakke (Li jt., 2013).



**Joonis 3.** VLP-de jaotus struktuuride järgi. Ümbriseta VLP-d jaotatakse ühe-, kahe-, või kolmekihilise kapsiidiga VLP-deks. Ümbrisega VLP-d jaotuvad vaid viirus- või pseudotüpeerivate valkude arvu põhjal. (Lua jt., 2014) Autori kohandused.

VLP-de iseloomustamiseks on kasutatakse erinevaid meetodeid, et hinnata VLP-de morfoloogiat ja koostist. Analüüside hulka kuuluvad näiteks aminohapete koostise määramine, molekulaarmassi määramine ja VLP puhtuse määramine. Kuigi massispektromeetria abil oleks võimalik kõiki

mainitud omadusi määrata ei ole see alati kättesaadav või taskukohane. VLP-de puhtuse määramiseks on sageli lihtsam ning odavam kasutada immunoloogilisi meetodeid, näiteks Western blot või ELISA analüüsi. Tavainformatsiooni VLP-de morfoloogia kohta saab standardse elektronmikroskoopia abil. (Lua jt., 2014)

### **1.3. Viiruseid neutraliseerivad antikehad**

Viiruste vastast kaitset vahendab inimestel kaasasündinud ja adaptiivse immuunsüsteemi koostöö, mis üritab takistada viiruste sissetungi rakkudesse ja nende paljunemist organismis (Mascola ja Haynes, 2013). Meditsiinis kaitstakse viirusnakkuste vastu immuniseerimise abil, mida võib jaotatakse aktiivseks ja passiivseks immuniseerimiseks. Aktiivse immuniseerimise korral tutvustatakse kehale võõrast antigeeni (nt viiruse pinnavalku(valke)), millega aktiveeritakse organismis selle antigeeni spetsiifiliste antikehade tootmine. Hilisema viirusnakkuse korral toimub kiire spetsiifiliste antikehade paljundamine, mis võib (kuid ei pruugi) elimineerida viirusnakkuse enne kui see organismi haigestumist põhjustab. Selline immuniseerimine võib võtta kauem aega ning vajada mitut kordust, kuid edukate vaktsiinide korral on kaitse on sageli pikaajaline või isegi eluaegne. Passiivse immuniseerimise korral aga manustatakse patsiendile juba valmis spetsiifilisi antikehasid kindla haigustekitaja vastu, mis kaitseb küll vähem aega, kuid toimib koheselt. Passiivset immuniseerimist saab kasutada mitte ainult ennetamiseks vaid ka juba avaldunud haigussümptomite raviks. (Baxter, 2007).

Immuniseerimisel võib aga probleemiks osutuda viiruste kavalad võtted ennast maskeerida või muuta enda valkude koostist inimese omale sarnasemaks, mille tõttu organismis ei teki viirust inhibeerivat immuunvastust. Selleks, et immuniseerimine toimiks efektiivselt, peab vastus olema suunatud unikaalsele ning viirusele funktsionaalselt olulisele komponendile, selliselt, et immuunvastus (nt antikeha seondumine) kahjustaks selle funktsiooni ja seeläbi viiruse elutsükli läbiviimist. Sellele kriteeriumile vastavaid antikehi nimetatakse neutraliseerivateks antikehadeks. (Berman jt., 2000)

Seega on viirusvastaste vaktsiinide arendamise eesmärgiks tekitada inimesel neutraliseerivate antikehade põhine vastus. Näiteks on suur osa HIV vaktsiiniuuringutest, mis sai alguse selle viiruseavastamisest aastal 1983 (Barré-Sinoussi jt., 1983, Gallo jt., 1983), suunatud just

vaktsiinide leidmisele, mis indutseeriks paljude viirustüvede ja mutantide vastaseid laialdaselt neutraliseerivaid antikehi (bNAb – *broadly neutralizing antibodies*) (Mascola ja Haynes, 2013). Sama kehtib ka näiteks gripiviiruste, ebolaviiruste ning paljude teiste ohtlike viiruste vastu.

Peamiseks raskendavaks asjaoluks Ebola vaktsiini otsingutel on just see, et ebolaviirusel on tuvastatud liike viis (*Zaire, Sudan, Cote d'Ivoire, Bundibugyo, Reston*) ning iga viiruse erinevused raskendavad ühtse ravimi tootmist. Kuigi seni on põhiliseks kahju tekitanud viiruse liigiks olnud Zaire ja Sudani ebolaviirused, siis ka teised võivad olla sama ohtlikud. Senised uuringud ongi fokuseeritud peamiselt Zaire ebolaviiruse vastu. (Hoenen jt., 2012) Ideaalseks lahenduseks oleks vaktsiinid, mis tunnevad ära ühe perekonna kõikidel viirustel esineva konserveerunud piirkonna või vastavad antikehad manustatuna passiivse immuniseerimisena. Üheks potentsiaalseks kandidaadiks kõigi ebolaviiruste liikide vastu on osutunud monoklonaalne laialdaselt neutraliseeriv antikeha koodnimega 6D6. Selle antikeha viirust neutraliseerivat efekti on näidatud edukalt hiire peal, kus ebolagaviirusega nakatunud hiired pärast 6D6-ga manustamist taastuvad täielikult iga ebolaviiruse liigi infektsioonist. (Furuyama jt., 2016) Kolmest eraldi välja arendatud kimäärsest monokloonses antikehast on arendatud vaktsiinikokteil Zmapp™ (Qiu jt., 2014). Vaktsiini on kasutatud ka inimeste immuniseerimiseks, kuid 2015 aasta ebolaviiruse puhangu mandumise tõttu aastal sai immuniseeritud vaid 72 isikut, jättes ravimi efektiivsuse küsimuse veel õhku (Group, 2016). Sellegi poolest on kasutatud antikehade kokteili ZMapp™ loomade täielikuks ravimiseks 5 päeva pärast infektsiooni (Qiu jt., 2014).

#### **1.4. Viirusnakkuste tuvastamisega seotud analüüsid**

Globaalsed pandeemiad on ohustanud meie ühiskonda juba pikka aega ning nende oht on jätkuv ning tõsine. Surmavate viiruste efektiivne ärahoidmine ja ravi on oluline teema tänapäeva viroloogia valdkonnas, millest võib sõltuda inimkonna ellujäämine. Seetõttu on ka oluline uurida ja avastada uusi ja tõhusaid meetodeid viirusinfektsioonide tuvastamiseks ja mõõtmiseks. (Souf, 2016) Kuigi modernne viirusnakkuste tuvastamine oli võimalik juba aastast 1948 (Weller ja Enders, 1948), siis efektiivseid meetodeid oli ikkagi väga vähesel määral ning nende realiseerimine võimalik ainult teatud paikades. See aga muutus kümme aastat hiljem kui hakkasid edenema väga puhtad reagendid ja kommertsiaalsed rakuliinid, mis laiendasid oluliselt analüüsidega määratavate viiruste arvu (Leland ja Ginocchio, 2007). Samuti on ka viiruste uurimine keeruline just vajaduse

tõttu järgida bio-ohutuse reegleid. Näiteks kasutatakse kliiniliselt ja majanduslikult kõige ohtlikumate viiruste uurimiseks tehniliselt väga keerukaid BSL-4 laboreid ning uurimised võivad võtta kaua aega ning kulutada palju ressursse. Peamised viirusnakkuste tuvastamise meetodid on järgmised:

- Elektronmikroskoopia
- Rakukultuuri meetod
- Komplementi fikseerimise test (CFT)
- Hemagglutiniini inhibitsiooni test
- EIA (*Enzyme-linked immunoassay*) / ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)
- Amplifikatsiooni-põhised meetodid
- Massispektromeetria
- Viiruslaadsetel partiklidel põhinevad testid

#### **1.4.1. Elektronmikroskoopia meetod**

Elektronmikroskoopia on arenenud riikides olnud pikka aega kasutusel, kui otsene meetod viiruste tuvastamiseks. Selle abil nähtavaid viiruseid saab morfoloogiliselt kirjeldada. Samas peab selle meetodi kasutamisel silmas pidama, et preparaate ette valmistamisel võivad viiruste hulk proovis väheneda. Samuti ei ole elektronmikroskoopia kvantiteeritav. Elektronmikroskoopia meetod on aga siiski tänapäevani laialdaselt kasutatud leidev meetod viirusnakkuste tuvastamiseks ning vägagi efektiivne kombineerituna rakukultuuri meetodiga. (Souf, 2016)

#### **1.4.2. Rakukultuuri meetod**

Rakukultuuri meetod on üks populaarsemaid meetodeid viiruste isoleerimiseks. Selle meetodiga on võimalik näha spetsiifilisi muudatusi rakkudes (Robbins jt., 1950), mis on viirusega nakkunud ning teha järeldusi patogeeni mõjust rakule. Lisaks saab viiruse identifitseerimiseks kasutada kombineerimist immunoloogiliste meetoditega, näiteks viirusvalkude tuvastamist immunofluorestsents analüüsiga. Samas pole rakukultuuri meetod sobilik nendele viirustele, mille jaoks puudub nende nakatamiseks ja paljundamiseks sobiv rakuliin (Papafraqkou jt., 2013).

### **1.4.3. Hemagglutiniini inhibitsiooni test**

Hemagglutiniini inhibitsiooni testi arendas välja Ameerika viroloog George Hirst aastal 1941 – 42. See meetod lubab kvantiteerida viiruste või bakterite vastaste antikehade kontsentratsioone, kasutades ära hemagglutiniini valkude agregeerumist punaste vereliblede pinnal. (Hirst, 1942) Hemagglutiniin on gripiviiruse pinnavalk, ehk glükoproteiin, mis seondub punaste vereliblede pinnaretseptoritega ning kõrge viiruse kontsentratsiooni korral agregeeruvad need omavahel ning tekib nn nähtav võre. Kui patsiendi proovis on viiruse kontsentratsioon väike, agregeerumist ei toimu ning vererakud settivad põhja. Meetodit on lihtne läbi viia ning vajab väheseid kulutusi, mistõttu on meetod laialdaselt kasutust leidnud. Küll aga saab meetodit kasutada peamiselt ainult arbo- ja gripiviiruste tuvastamiseks. (Souf, 2016)

### **1.4.4. EIA/ELISA (*Enzyme-linked immuno (sorbent) assay*)**

EIA ja ELISA meetodid põhinevad võõrkeha vastu tekkinud antikehade tuvastamisel patsientide seerumist ning on üks laialdasemalt kasutust leidnud meetod viirusnakkuste tuvastamiseks. Meetodi eelisteks on kõrge spetsiifilisus ja tundlikkus, kuid tegemist on siiski suhteliselt kuluka analüüsiga, mis vajab suurt täpsust. (Souf, 2016) Valdavalt kasutatakse neis testides tahkele substraadile kinnitatud siduvaid viirusspetsiifilisi (püüdvaid) antikehasid ning ensüümiga konjugeeritud tuvastavaid antikehasid. Uuritavas proovis viiruse esinemisel tekib tahkele substraadile kompleks püüdev antikeha – viirus- tuvastav konjugeeritud antikeha ning konjugeeritud ensüümi abil saab kompleksi moodustumise määrata (nt kolorimeetrilise värvusreaktsiooniga). Sarnast lähenemist saab kasutada ka viirusnakkusele viitava viirusvastaste antikehade määramiseks seerumist, kinnitades tahkele substraadile viiruse valgu (antigeeni), et moodustuks tuvastatav kompleks viiruse antigeen – viirusvastane antikeha – tuvastav konjugeeritud antikeha. (Engvall ja Perlmann, 1971, Van Weemen ja Schuurs, 1971, Horlock, 2016)

### **1.4.5. Viiruse genoomi amplifikatsiooni-põhised meetodid**

PCR-i kasutamine viiruste tuvastamisel on olnud kasutusel juba peaaegu selle meetodi välja töötamisest saati. Selle abil tuvastatakse viiruseid nende genoomi fragmentide spetsiifilise amplifitseerimise abil ning neid teste kutsutakse NAAT-ideks (*nucleic acid amplification tests*).



Eriti kasulikud on need testid tänu oma võimalusele määrata viiruse hulka proovis, mis võib anda ülevaate nakkuse tõsidusest. Sellised PCR-põhised meetodid on ka reaalaaja PCR, mis võimaldab täpsemalt signaali kvantiteerida ning RT (*reverse transcription*)-PCR, mille abil on võimalik uurida RNA-viiruseid, tehes esmalt viiruse mRNA-st komplementaarse c(*complemetnary*)DNA, mis on siis amplifitseeritav PCR-ga. (Jackson, 1990, Ntziora jt., 2013, Souf, 2016)

#### **1.4.6. Viiruslaadsetel partikkelitel põhinevad testid**

On näidatud, et sageli on VLP-d, mis mimikeerivad viiruse morfoloogiat ja eksponeerivad nakatumiseks olulisi valke, võimelised sisenema rakkudesse mehhanismiga, mis on sarnane autentse viirusnakkusega (Puig-Basagoiti jt., 2005, Martinez jt., 2010, Qing jt., 2010). Sageli on nende kasutamise eesmärk seotud viiruste sisenemise uurimise või inhibeerivate ravimikandidaatide testimisega. Kuna autentsete viiruste kasutamisega käivad kaasas tõsised riskid, siis VLP-de kasutamine on sageli ohutu ja odav alternatiiv uurimaks viiruste infektsioone ning leidmaks sobilike ravimikandidaate. (Ludwig ja Wagner, 2007) VLP-de kasutamist aga patsientide diagnoosimiseks seni rakendatud ei ole, tehes meetodi sobivaks viiruse uuringute läbiviimiseks.

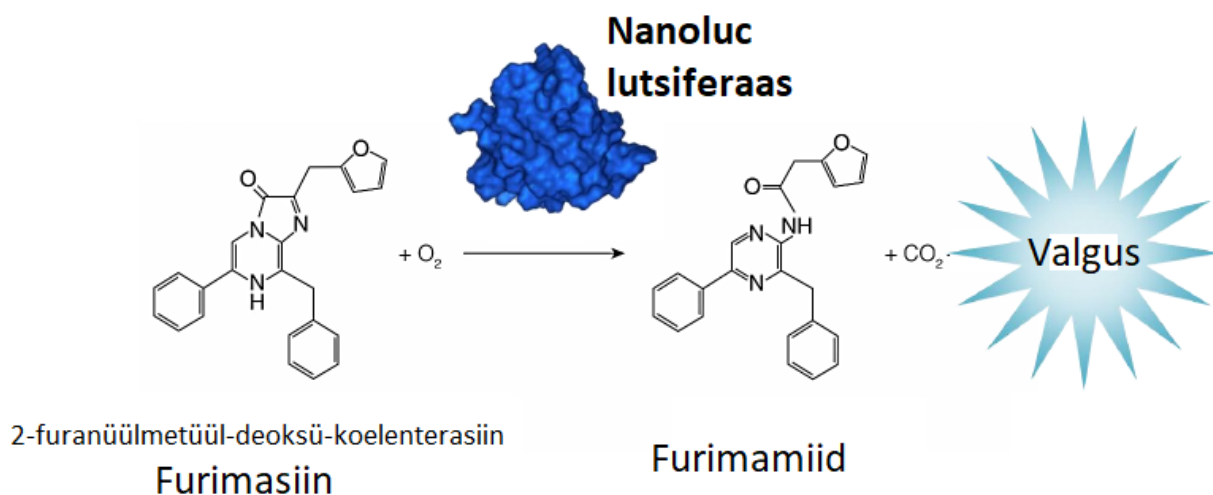
#### **1.5. Ebola VLP-d**

Ebola VLP-de moodustamiseks aga piisab, kui imetajarakkudes ekspresseerida kahte struktuurset valku, milleks on VP40 ja GP. VP40 on ebolaviiruse maatriksivalk, andes VLP-le viirusele sarnase kuju ning on struktuuselt oluliseks üksuseks VLP-de moodustamisel. GP on ebolaviiruse pinnavalk, mille kaudu VLP on võimeline rakkudesse sisenema ning on oluliseks valguks ravimikandidaatide otsinguil. Ebola VLP-de tootmist on teostatud näiteks inimese embrüonaalsete neerurakkude liinis 293 (Bavari jt., 2002, Noda jt., 2002, Swenson jt., 2004) Ebola VLP-d on võrreldes autentse ebolaviirusega kujult ebakorrapärased, olles nii kerakujulised kui ka filamentsed. VLP-de pikkuseks on hinnatud 400 – 600 nm ning laiuseks 70 – 100 nm. Ebola VLP-sid on üritatud kasutada otsese vaktsiinina mitmetel kordadel, kuid tulemused on näidanud, et VLP-põhised vaktsiinid ei anna inimestele täielikku immuunsust. (Warfield ja Aman, 2011) Samas võib Ebola VLP-sid kasutada, et tuvastada potentsiaalseid ravimikandidaate. Selleks luuakse süsteem, kus VLP rakku sisenemisel tekib tuvastatav ja eelistatavalt kvantiteeritav signaal, mis annab

uurijale informatsiooni nt neutraliseerivate antikehade efektiivsuse määramisel või ebolaviiruse rakku sisenemise muude mehhanismide uurimisel. Selliseid süsteeme on ka varasemalt üritatud luua, kasutades reporteritena jaanimardiklaste lutsiferaasi valku (Fluc) ja  $\beta$ -laktamaasi. Nende eesmärgiks on anda helendavat kvantiseeritavat signaali uurijale, kui VLP-d eeldatavas või soovitavas asukohas paiknevad. Selleks on reportervalgud tavaliselt fuseeritud ebolaviiruse maatriksivalgu VP40 N- või C-terminaalse osa külge, mis VLP formeerumisel VP40 struktuuri osaks saab. VLP-de sisenemisel või inhibeerimisel on seejärel võimalik mõõta RLU-d (*relative light units*), või fluorestsentsi ning teha vastavad järeldused VLP-de sisenemise või paiknemise kohta, olles sobivaks meetodiks ravimikandidaatide otsingul. (McCarthy jt., 2006, Martinez jt., 2010, Li jt., 2016)

### **1.5.1. Nanolutsiferaas ebolaviiruse VLP-de reporterina**

Eespool refereeriti ebola VLP-des kasutatud erinevaid reportervalke, nagu näiteks  $\beta$ -laktamaas ja jaanimardiklaste lutsiferaas. (McCarthy jt., 2006, Manicassamy ja Rong, 2009, Li jt., 2016) Siinkohal võib aga probleemiks osutuda reportervalgude suurus, kus vastavate valgude ruumiline paiknemine segab VLP-de moodustamist või rakkudesse sisenemist (Sasaki jt., 2018) Firma Promega on arendanud välja väikse molekulmassiga (19,1 kDa) ATP-sõltumatu lutsiferaasi reportervalgu Nanoluc, mis furimasiini substraadi lisamisel tekitab kemoluminestsentsisignaali (joonis 4).



**Joonis 4.** Nanolutsiferaasi ja hapniku toimel muudetakse furimasiini molekul luminestantsseeruvaks furimamiidi molekuliks.

Eraldati see valk krevetist *Oplophorus gracilirostris* ning võrreldes teiste laialt kasutatavate lutsiferaasidega, Rluc (*Renilla* lutsiferaas – 36 kDa) ja Fluc (*Firefly* lutsiferaas – 61 kDa), on selle väikese valguluminestantsi intensiivsus kuni 150 korda suurem. Samuti on nanolutsiferaasi valk elavas rakus stabiilsem kui seni välja töötatud lutsiferaasid. (Hall jt., 2012) Paar aastat hiljem lisandus uus nanolutsiferaasil põhinev reportersüsteem, kus kasutati nanolutsiferaasi 1,3 kDa suurust subühikut NanoBit, mille efektiivsus on sarnane NanoLuc-le ning see on eriti sobiv valk-valk interaktsioonide uurimiseks. (Dixon jt., 2015)

## **2. EKSPERIMENTAALNE OSA**

### **2.1. Töö eesmärk**

Magistritöö eesmärk oli leida sobiv meetod viirusnakkuse (nt ebolaviiruse või HIV viiruse) efektiivsuse mõõtmiseks, kasutades viiruse rakku sisenemise tuvastamiseks nanolutsiferaasi aktiivsusega viiruslaadseid partikleid. Patogeensete viirustega töötamine on sageli keeruline, komplitseeritud ja piiratud kättesaadavusega. Seega on soodne kasutada võimalusel analüüse, kus viiruse asemel rakendatakse viirust mimikeerivaid mittereplitseeruvaid ja mittepatogeenseid viiruslaadseid osakesi (VLP-sid). Viirusnakkuse efektiivsuse määramiseks on vajalik valmistada VLP-d, mis viiruse pinnavalkude abil seonduks sihtmärkrakkudega ning seejärel internaliseeritaks sarnaselt autentsele viirusele. Käesolevas töö eesmärgiks oli testsüsteemi loomine, milles kasutatakse viiruse pinnavalkudega pseudotüpeeritud Ebola maatriksivalgu VP40 põhiseid VLP-sid, millele on lisatud on tuvastatav ensümaatiline (lutsiferaasne) aktiivsus. Seega saab VLP-de rakku sisenemist (nakatamist) mõõta rakkudes tekkiva lutsiferaasi aktiivsuse kaudu. Antud testsüsteem oleks kasutatav nakatumist inhibeerivate ravimikandidaatide (näiteks neutraliseerivate antikehade) tuvastamiseks ja nende tõhususe testimiseks. VLP-de põhise testsüsteemi koostamine oli esimene etapp mahukamast arendusest, mis hõlmaks ka kandidaatantikehade skriinimist ja potentsiaalse ebolaviiruseid neutraliseeriva antikeha humaniseerimist.

## 2.2. Materjal ja metoodika

### 2.2.1. Töös kasutatud eukarüootsete rakkude tüved ja nende kasutamise eesmärk

**Tabel 1.** Eukarüootsete rakkude tüved ning nende kasutamise eesmärk

Raku tüvi	Kirjeldus ja kasutamise eesmärk
HEK-293ALL ( ingl. K. <i>Human Embryonic Kidney</i> )	Inimese embrüonaalsete neerurakkude liinist (Graham jt., 1977) pärinev modifitseeritud rakuliin (Icosagen) , mida kasutati VLP-de tootmiseks.
HeLa (Henrietta Lacksil)	Inimese emakakaela vähist lähtuv rakuliin (Scherer jt., 1953) , mida kasutati VLP-de rakkudesse sisenemise hindamiseks.
Vero E6	Ebola viirusele vastuvõtlik rakuliin (Earley ja Johnson, 1988), mida kasutati VLP-de rakkudesse sisenemise hindamiseks.
TZM- bl	HIV nakkuste tuvastamiseks sobilik HeLa rakuliin, mis ekspresseerib suurtes kogustes CCR5 ja CD4 retseptoreid HIV viiruse sisenemiseks. Samuti sisaldab rakuliin HIV-1 promooteri all olevaid $\beta$ -galaktosidaasi ja lutsiferaasi geene. (Platt jt., 1998, Derdeyn jt., 2000, Wei jt., 2002, Takeuchi jt., 2008, Platt jt., 2009) Rakke kasutati VLP infektsioonil VLP-de sisenemise hindamiseks.

Eukarüootsete rakkude kasvatamiseks kasutati Gibco DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) või IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) kasvukeskkonda, millesse lisati vajadusel 10% Gibco veise loote seerumit (FBS – *fetal bovine seerum*) ning 1% penitsilliin/streptomütsiin antibiootikume. Rakkude kasvatamine toimus 37 °C ja 8% CO<sub>2</sub> juures. 293ALL rakuliini kasvatati seerumvabas söötmes BalanCD HEK293 (Irvine Scientific), kasutades HyClone Boost 5 (GE Life Sciences) lisandit rakkude efektiivsemaks kasvuks.

### 2.2.2. DNA kloneerimine

#### 2.2.2.1. Restriktsioon

DNA-fragmentide saamiseks kasutati restriktsiooniensüümidega lõikamist. Restriktsioonisegu kokku segamiseks kasutati 0,5 µg DNA-d, 2 µl 10x FastDigest puhvrit (Thermo Fisher Scientific), 0,5 µl valitud restriktsiooniensüümi (Thermo Fisher Scientific), vajadusel 1 µl kuumatundlikku aluselist fosfataasi FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase) (Thermo Fisher Scientific)

ning destilleeritud H<sub>2</sub>O-d kuni mahuni 20 µl. Sellist restriksioonisegu inkubeeriti restriksiooniensüümi töötemperatuuril 30 min. Tekkinud DNA fragmendid lahutati TAE-agaroosgeelelektrofooresiga, visualiseeriti EtBr värvimisega ning DNA fragmentide pikkuse hindamiseks kasutati sobivat suurusmarkerit (Thermo Fisher Scientific).

#### **2.2.2.2. DNA geelist puhastamine**

DNA puhastati geelist kasutades Zymoclean™ Gel Recovery (Zymo Research) komplekti vastavalt tootja eeskirjale. Geelektrofooresi järel lõigati soovitud DNA fragment skalpelliga agaroosist välja ning kaaluti. Seejärel lisati 3 massiosa agaroosi lahustavat puhvrit ADB (*agarose dissolving buffer*) ühe geelitüki kohta. Geeli ja ADB segu inkubeeriti 55 °C juures 10 min kuni agaroosgeeli täieliku sulamiseni. Seejärel kanti lahus DNA-d siduvale komplekti kolonnile ning seondumine teostati tsentrifuugides. Pärast pesemist komplektis oleva pesulahusega elueeriti puhastatud DNA veega.

#### **2.2.2.3. Fragmentide ligeerimine**

Puhastatud DNA fragmente (vektor ja insert) ligeeriti suhtes ~1:3 (molaarne suhe), kasutades selleks T4 ligaasi ja ligaasipuhvrit (kõik reagentid firmast Thermo Fisher Scientific). Ligeerimine toimus toatemperatuuril kuni 2h. Ligeerimisreaktsiooni kasutati *E. coli* transformeerimiseks nagu on kirjeldatud järgnevas peatükis.

#### **2.2.2.4. Transformatsioon**

Transformatsioon viidi läbi *Escherichia coli* DH5α (Woodcock jt., 1989) kompetentsete rakkudega, mis valmistati RF-meetodiga (Nishimura jt., 1990) või komplektiga Zymo Mix & Go komplektiga (Zymo Research). Plasmiidse DNA paljundamiseks kasutati RF-kompetente ning ligatsioonisegu transformeerimiseks Zymo kompetetseid rakke.

RF kompetentsete rakkude abil transformeerimiseks pandi esmalt 100 µl sügavkülmutatud rakukultuuri jääle sulama. Sulanud rakukultuurile lisati plasmiidne DNA (50-100 ng). Järgnevalt inkubeeriti DNA ja kompetentide segu jääs 30 min. Seejärel inkubeeriti 2 min 37 °C juures ning uuesti 1 min jääs. Rakukultuurile lisati 900 µl LB (*lysogeny broth*) vedelsöödet ning inkubeeriti

kuni 45 min 37 °C juures. Pärast inkubeerimist võeti 100 µl rakukultuuri ning plaaditi rakukultuur LB-kanamütsiin (Km) tardsöötmele üleöö kasvamiseks 37 °C juures. Järgneval päeval suspendeeriti üksikud Km-resistentsed bakterikolooniad 2 ml-s LB-Km vedelsöötmes ning tekitati plasmidi sisaldav bakterimass, kasvatades üleöö 37 °C juures.

Zymo kompetentsete rakkude abil transformeerimiseks pandi esmalt 100 µl sügavkülmutatud rakukultuuri jääle sulama. Sulanud rakukultuurile lisati DNA ligatsioonisegu (kuni 20 µl). Järgnevalt inkubeeriti DNA ja kompetentide segu jääl 5 min. Seejärel inkubeeriti 2 min 37 °C juures ning uuesti 1 min jääl. Rakukultuurile lisati 900 µl LB vedelsöödet ning inkubeeriti kuni 45 min 37 °C juures. Pärast inkubeerimist tsentrifuugiti rakud põhja 6000 p/min 3 min jooksul ning võeti üles 100 µl-s LB vedelsöötmes. Edasi plaaditi rakukultuur LB-Km söötmele üleöö kasvamiseks. Järgneval päeval suspendeeriti üksikud kolooniad 2 ml-s LB-Km vedelsöötmes ning kasvatati üleöö 37 °C juures.

#### **2.2.2.5. Plasmiidse DNA puhastamine**

Bakterimassist plasmiidse DNA puhastamiseks kasutati FavorPrep<sup>TM</sup> plasmiidieralduskomplekti (Favorgen). Üleöö kasvanud 1.5 ml bakterikultuur sadestati, tsentrifuugides 11 000 g juures 1 min. Sadestatud bakterimass suspendeeriti 200 µl FAPD1 (koos RNAaas A-ga) puhvris. Rakkude lüüsimiseks lisati 200 µl FAPD2 puhvrit ning segati, keerates tuube üle otsa kuni 10 korda ning inkubeeriti 2-5 min toatemperatuuril. Lüsandi neutraliseerimiseks lisati 300 µl FAPD3 puhvrit ning segati koheselt, keerates tuube kuni 10 korda. Plasmiidset DNA-d sisaldava vedelfraktsiooni eemaldamiseks tuube tsentrifuugiti täiskiirusel 5 min. Selle aja jooksul pandi valmis FAPD kolonn ja kogumistuubid. Supernatant tõsteti ümber DNA-d siduvasse kolonni ning seoti, tsentrifuugides 11 000 g juures 30 sekundit. Supernatant eemaldati ning lisati 200 µl EndoWash pesupuhvrit. Kolonni tsentrifuugiti 11 000 g juures 30 sekundit. Teine pesu viidi läbi 400 µl W1 puhvriga ning samuti tsentrifuugiti 11 000 g juures 30 sekundit. Kolmas pesu viidi läbi 700 µl pesupuhvriga ning samuti tsentrifuugiti 11 000 g juures 30 sekundit. Seejärel kuivatati kolonn täiskiirusel tsentrifuugimisega 3 min ning tõsteti ümber uude 1,5 ml tuubi. Kolonnile lisati 50 – 100 µl destilleeritud vett ning plasmiidne DNA elueeriti 1 min täiskiirusel tsentrifuugimisega.

### 2.2.3. VLP-de tootmine

VLP-de tootmine algas VLP-de moodustumiseks vajalike valke tootvate ekspressiooniplasmiidide transfekteerimisega HEK239ALL rakuliini. Transfekteerimine viidi läbi keemilise transfekteerimisreagendi Reagent 007 abil (Karro jt., 2015). Esmalt valmistati ette rakud, kogudes need 15 ml või 50 ml tuubidesse. Seejärel tsentrifuugiti rakud põhja (200g, 5 min, 20 °C). Supernatant eemaldati ja lisati vastav kogus Gibco FreeStyle™ CHO ekspressioonisöödet (Thermo Fisher Scientific) kasvukeskkonda. Kultuur jagati kolvidesse vastavalt transfektsioonide arvule. Seejärel asetati rakud loksutile 37 °C juures. 10 ug Plasmiidset DNA-d lahjendati 200 µl-s vees. Lisati 300 µl 100 mM Reagent 007 s ning DNA-007 kompleksil lasti moodustuda 5 min. Seejärel lisati kompleks rakkudele ning inkubeeriti 37 °C. Pärast kolme tunni möödumist lisati ka juurde Gibco Freestyle CHO ekspressioonisöödet (Thermo Fisher Scientific) kasvukeskkonda ja Hyclone Boost 5 (GE Life Sciences) lisandit. 293ALL rakuliini lahjendatakse iga 2 või 3 päeva tagant tiheduseni  $5 \times 10^5$  rakku/ml ning lisati ka adenoviiruse ekspressioonisöödet AEM (Thermo Fisher Scientific) ja Hyclone Boost 5 (GE Life Sciences) lisandit. Järgnevalt kasvatati rakke kuni 6 päeva või rakkude elulemuse langemiseni alla 90%.

### 2.2.4. VLP-de puhastamine

VLP-de puhastamiseks saadi algmaterjal, eraldades transfekteeritud 293ALL rakukultuurist supernatandi, tsentrifuugides kultuuri 1000g, 30 min. Seejärel supernatant filtreeriti läbi 0.4 µm pooriga filtri. Edasine VLP-de puhastamine teostati Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis dr. Reet Kure juhtimisel. Esmalt sadestati partikulaarne materjal, kandes 25 ml supernatanti 20% sahharoosi padjale PBS-is ning tsentrifuugiti ultratsentrifuugiga (Beckman) SW28 rootoriga 3 tundi, 131000 g 4°C juures. Sade suspendeeriti 300 µl PBS-s ning VLP-de edasine fraktsioneerimine teostati tsentrifuugimisega läbi astmelise iodiksanool-gradiendi (Opti-prep, Sigma-Aldrich). Gradient formeeriti alates põhjast järgmiselt: 1 ml 50% 1 ml 30%, 1 ml 20% 1 ml 10% ning opti-prepi lahjendamisel kasutati PBS-i. Gradiendile kanti 300 µl sadestatud materjali ja ultratsentrifuugiti SW55 rootoriga 1.5 tundi, 124000 g 4°C juures. Tsentrifugimise tulemusena eristusid neli silmaga nähtavat vööti, mis koguti edasisteks uuringuteks, alikvooditi, külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -70 °C juures.



### **2.2.5. Valgukonstsentratsioonide hindamine (BCA)**

Puhastatud VLP-proovide totaalse valgukonstsentratsioone hinnati, kasutades komplekti Pierce<sup>™</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientific). Protseduuri alustamisel segati kokku töölahus, kasutades selleks reagenti A (Naatriummkarbonaat, naatirumbikarbonaat, bikikhoniinhape, kaalium tartaraat – 0,1 M kaaliumhüdroksiidi lahuses) ja reagenti B (4% vask(II)sulfaadi lahus). Valgukonstsentraatide hindamisel kasutati ka standardkonstsentraatidega veise seerumi albumiini lahuseid. VLP-proovide lahjendustele ja standardlahustele (25 µl) lisati 500 µl valmistatud töölahust. Pärast segamist asetati proovid 37°C vesivanni 30-ks minutiks inkubeerima. Järgnevalt proovid jahutati ning mõõdeti kolorimeetriselt proovide neelduvused lainepikkusel 562 nm. Standardi andmete lineaarse regressiooniga leiti valgukonstsentratsiooni ja neelduvuse seose arvutusvalem ning seejärel arvutati VLP proovide valgukonstsentratsioonid.

### **2.2.6. Rakkude nakatamine VLP-dega**

Rakkude nakatamiseks toodetud VLP-dega, kasutati aktiivses kasvufaasis olevaid sihtmärk rakuliine (HeLa, TZM-bl, Vero E6). Nakatamisele eelneval päeval külvati rakud 96-süvendiga plaadi süvenditesse tihedusega 5000 rakku/süvend. Vahetult enne nakatamist valmistati ette VLP-de lahjendused eelsoojendatud kasvukeskkonnas. Seejärel hinnati rakkude morfoloogiat ja elumust ning rakke loendati. Nüüd lisati VLP-de lahjendused, kasutades alati vähemalt 2 kordust. Seejärel inkubeeriti rakke VLP-dega kuni 4 h 37°C kraadi juures. Järgnevalt mõõdeti nakatumise efektiivsust, mõõtes rakkudes tekkinud lutsiferaasi Nanoluc suhtelist aktiivsust.

### **2.2.7. Nakatumise efektiivsuse mõõtmine Luminesentsi kaudu**

VLP-dega nakatatud rakkude luminesentsi mõõdeti, kasutades komplekti Nano-Glo® Luciferase Assay System (Promega) ning luminomeetrit Glomax<sup>™</sup> 20/20 (Promega). Komplekt koosneb kahest komponendist: Lüüsimislahus/reaktsioonpuhvrist ning nanolutsiferaasi substraadist (furimamiidist), mis töölahuse saamiseks segati suhtega 1:50. Pärast rakkude nakatamist VLP-dega eemaldati rakkude sööde ning süvendeid pesti ettevaatlikult 3 korda PBS-ga, vältides süvendi põhja kinnitunud rakkude lahti tulemist. Seejärel lisati kokku segatud töölahust igasse süvendisse 100 µl ning oodati 3 min lüüsimise toimumiseks. Seejärel tõsteti suspensioon 1,5 ml

reaktsioonituubidesse, mis asetati luminomeetrisse ning mõõdeti suhtelised valgusühikud (RLU-d, *relative light units*).

### 2.2.8. Western blot

Valgualanaliüsid VLP-de kohta viidi läbi kasutades Western blot metoodikat, mille kohaselt valgud lahutatakse geelis ning huvipakkuv valk tuvastatakse spetsiifilise antikehaga äratundmise kaudu. Valguproovid denatureeriti redutseerivates tingimustes, kasutades proovipuhvrit Sigma-Aldrich 2x Laemmli (60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glütserool, 5%  $\beta$ -merkapotetanool, 0.01% bromofenool sinine) (Laemmli, 1970) + DTT (ditiotreitool) ning inkubeeriti 100 °C juures 5 min. Valgud lahutati 10% või 12% SDS-polüakrüülamiidgeelis, mis valmistati kasutades järgmiseid koostisosi: H<sub>2</sub>O, 30% akrüülamiidi segu, 1,5 M (pH 8,8) ning 1 M (pH 6,8) Tris-EDTA (tris(hüdroksümetüül)aminometaan etüülenediamiintetraädikhape), 10% SDS (naatrium dodetsüülsulfaat), 10% APS (ammoonium persulfaat), TEMED (tetrametüületüülenediamiin). Geeli lahus valati klaasplaatide vahele ning peale lisati destilleeritud vett, et hoida ära kuivamist ning tagada geeli lahutava osa ühtlane pind. Geelil lasti tarduda 30 min toatemperatuuril ning seejärel kallati ära pealmine veekiht. Klaasplaatide vahele kallati 5% kontsentreeriva geeli segu kuni klaasplaatide ülemise servani ning peale asetati sobiv kamm proovi laadimiseks süvendite saamiseks. Geelil lasti tarduda järgnevad 30 min. Järgnevalt eemaldati kamm ning asetati geeliga klaasplaadid elektroforeesi tugimoodulisse Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories). Seejärel asetati tugimoodul foreesiaparaati ning täideti foreesiaparaat ning tugimooduli sisemus 1x SDS foreesi puhvriga (25 mM Tris, 192 mM glütsiin, 0,1% SDS). Seejärel lisati valguproovid geeli süvenditesse koos sobiliku molekulmassi markeriga. Foreesiaparaat suleti kaanega ning forees teostati fikseeritud pingega 70 – 100 V. Foreesi lõppedes eemaldati tugimoodul ja eemaldati klaasplaadid üksteisest. Geeli suurus mõõdeti ning see tasakaalustati *semi-dry* ülekandepuhvris (1,92 M glütsiin, 250 mM Tris, 10% metanool) 5-10 min. Lõigati geeli suurusele vastavad filterpaberitükid ja PVDF (*polyvinylidene difluoride*) membraani tükk (Merck Millipore). Kaks filterpaberitükki märjati Semi-dry ülekandepuhvris ning PVDF membraan märjati metanoolis ning seejärel Semi-dry ülekandepuhvris. Ülekandeaparaadi Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories) anoodile assambleeriti „ülekandevõileib“ järgnevalt:

- 1) märjatud filterpaber
- 2) märjatud PVDF membraan

3) tasakaalustatud geel

4) märjatud filterpaber

Järgnevalt asetati katoode (ülemine plaat) ning teostati valkude ülekanne geelist filtrile elektrivoolu abil (30 V, 45 min). Pärast ülekannet loputati membraan Western bloti pesulahuses (2,5 mM Tris, 0,15 M NaCl, 0,05 % Tween-20). Immunoanalüüsiks valmistati 4% blokeerimislahus (lõssipulber lahustatud PBS-is) ning membraani inkubeeriti selles lahuses 1h, et blokeerida mittespetsiifilised valguinteraktsioonid membraaniga. Membraani pesti 2 korda Western bloti pesulahuses ning valmistati primaarse antikeha lahjendus 2% blokeerimislahusesse. Membraani inkubeeriti huvipakkuvat valku äratundva primaarse antikeha lahusega 1h loksutil. Membraani pesti 4 korda Western bloti pesulahusega ning valmistati sekundaarse antikeha (mädarõika peroksidaasiga konjugeeritud antikeha, mis seondub primaarse antikehaga) lahjendus 2% blokeerimislahuses. Sekundaarse antikeha lahuses inkubeeriti membraani samuti 1 h loksutil. Membraani pesti 4 korda Western bloti pesulahuses. Signaal visualiseeriti, kasutades kromogeenset peroksidaasi substraati TMB Solution III (Sigma-Aldrich), millega inkubeeriti värvusreaktsiooni tekkeni. Seejärel peatati reaktsioon, loputades membraani destilleeritud vees ning membraan kuivatati.

#### **2.2.9. Coomassie värvimine**

VLP-de koostises olevate valkude üldiseks visualiseerimiseks kasutati värvimist värviga Coomassie Blue. Proovid lüüsi ja valgud lahutati SDS-polüakrüülamiidgeelis, nagu on kirjeldatud eelnevas peatükis. Geel asetati plastknõusse mis täideti Coomassie Brilliant Blue (Thermo Fisher Scientific) värvilahusega ning kuumutati mikrolaineahjus 40 sekundit. Geeli inkubeeriti värvilahuses 10 min loksutil ning seejärel pesti geeli kuuma destilleeritud veega kuni valgusignaalid eristusid taustast.

## 2.3. Tulemused ja arutelu

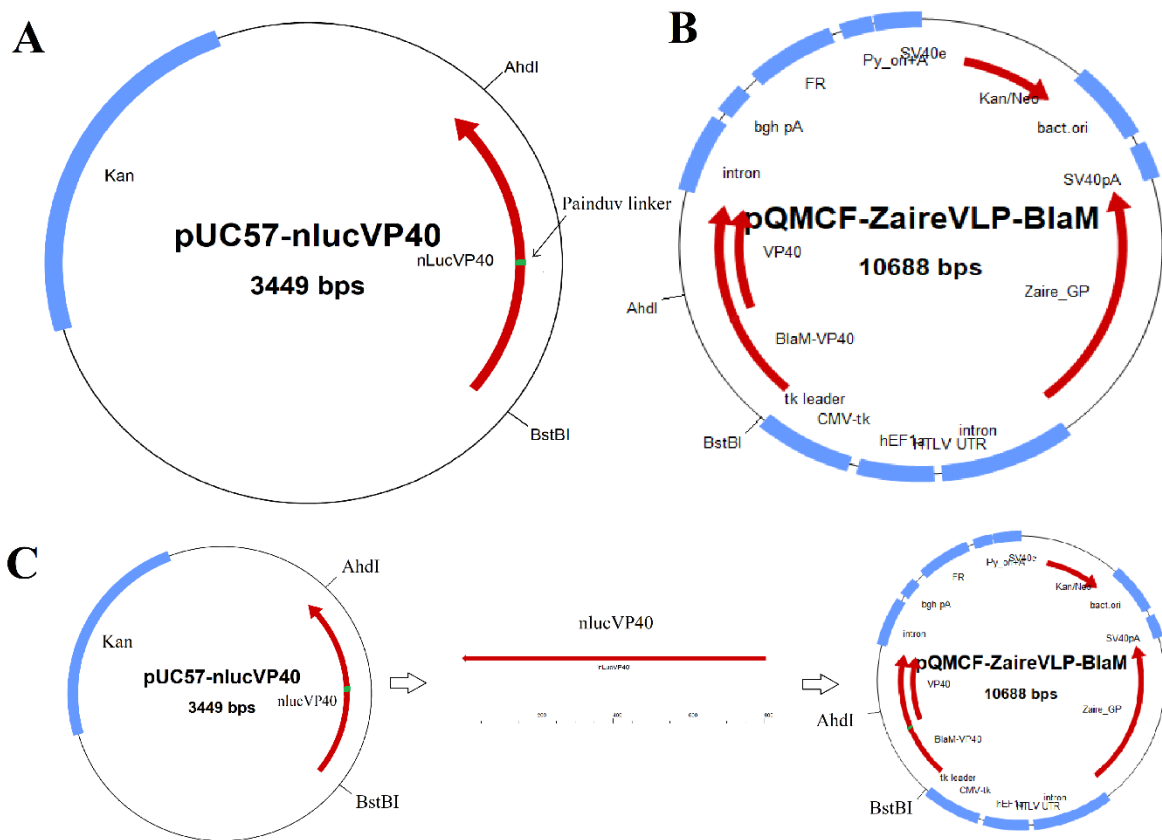
### 2.3.1. VLP tootmisvektorite arendamine, kasutades Icosagen QMCF tehnoloogiat

Töö eesmärgiks oleva meetodi jaoks vajalike nanolutsiferaasi aktiivsusega viiruslaadsete partiklite tootmiseks kujundati ja konstrueeriti vajalikud tootmisvektorid VLP-de tootmiseks eukarüootsetes rakkudes. Selleks otsustati kasutada Icosagen QMCF tehnoloogiat (Silla jt., 2005, USPTO patent nr 7790446), mis on arendatud just valkude tootmiseks imetajarakus ning kasutatud ka eelnevalt erinevate VLP-de tootmiseks (Icosageni publitseerimata andmed). QMCF rakuliinid ekspresseerivad stabiilselt kahte viiruse valku: Epstein-Barr viiruse (EBV) EBNA-1 valku ja polüoomiviiruse (PyV) suurt T-antigeeni. QMCF ekspressiooniplasmiidid sisaldavad lisaks huvipakkuva valgu ekspressioonikassetile ka EBV genoomi EBNA-1 seondumiskohtade kordusi (*Family of Repeats* (FR)) ja PyV replikatsiooni algupunkti (PyV ori). Nende cis-elementide interaktsioonid EBNA-1 ja T-antigeeniga tagavad ekspressiooniplasmiidi stabiilse replikatsiooni ja püsiva valgutootmise jagunevas rakukultuuris. VLP-de tootmiseks kasutati inimese embrüonaalse neerurakuliini 293 põhjal arendatud QMCF-rakuliini 293ALL. Töö esmaseks eesmärgiks oli toota neli erinevat vektorit, mis toodaksid Zaire ebolaviiruse matriksivalgu VP40 põhiseid VLP-sid, mille pinnal on eksponeeritud (ehk need on pseudotüpeeritud) erinevad viiruste pinnavalgud, mille funktsiooni blokeerimise kaudu saab takistada vastava viiruse sisenemist sihtmärkrakkudesse. Iga vektor pidi sisaldama kahte ekspressioonikasseti: ebolaviiruse matriksivalgu VP40 tootmiseks ning viiruselise pinnavalgu oma. Pinnavalkudeks valiti Zaire ebolaviiruse glükoproteiin GP, HIV-1 viiruse pinnavalk Env ning gripiviiruse pinnavalk HA. Lisaks konstrueeriti vektor, mis ekspresseerib ainult VP40 matriksivalku, et toota negatiivse kontrollina kasutatavaid pseudotüpeerimata VLP-sid.

#### 2.3.1.1. Tootmisvektori pQMCF nanolucVP40 GP valmistamine

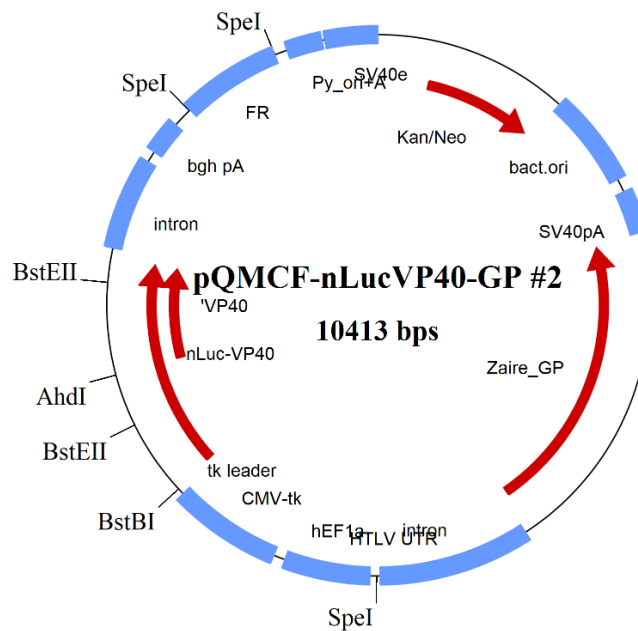
Nanolutsiferaasil põhineva testsüsteemi kujundamisel otsustati kasutada VLP-sid, mis moodustuvad, kui imetajarakkudes ekspresseerida piisaval tasemel ebola viiruse matriksivalku

VP40. Icosageni eelnevad uuringud olid näidanud, et selliste VLP-de moodustumine on efektiivne ja puhastamine suhteliselt lihtne. Ebola VLP-d katab rakumembraanist ümbris ning seega on membraanseoseliste valkude ko-ekspresseerimisel võimalik neid VLP-del eksponeerida. Näiteks on ebolaviiruse membraanseoselise viiruselise pinnavalgu (GP) ja VP40 imetaja rakkudes ko-ekspresseerimisel moodustuvate VLP-de pinnal eksponeeritud ka GP. Testsüsteemi peamiseks uudeks ideeks oli just struktuurivalgu VP40 modifitseerimine selliselt, et moodustuvatel VLP-del oleks tuvastatava ensümaatilise nanolutsiferaasi aktiivsus. Selleks fuseeriti VP40 N-terminaalselt nanolutsiferaasi valguga. Varasemalt on ka näidatud, et selline VP40 N-terminaalne fuseerimine reportervalguga ei kahjusta VLP-de moodustumist, mille tõttu otsustati kasutada sarnast taktikat (Manicassamy ja Rong, 2009). Selleks kujundati vastavat valgujärjestust (nLucVP40) kodeeriv, sünteetiline koodonoptimeeritud cDNA plasmidi pUC57-Kan. Kodeeritavas valgus on VP40 järjestusele lisatud nanolutsiferaasi valgu järjestus painduva linkeri kaudu (valgujärjestusega GSGGGSGGT) (joonis 5A). Seejärel tõsteti nLucVP40 cDNA ümber pQMCF-ZaireVLP-BlaM plasmidi (Icosagenis varasemalt valmistatud Ebola VLP vektor, mis ekspresseerib VP40 ja  $\beta$ -laktamaasi liitvalku BlaM-VP40 ning Ebola pinnavalgu prekursorit GP) (Joonis 5B). Asendamaks BlaM-VP40 nLucVP40-ga, asendati pQMCF-ZaireVLP-BlaM vektoris fragmendi AhdI-BstBI restriктаaside abil fragmendiga plasmidist pUC57-nLucVP40 (Joonis 5C).



**Joonis 5.** NLucVP40 konstrukti kloneerimine pQMCF ekspressioonivektoris. **A)** nLucVP40 valgusjärjestus. Tähistatud on nanoLuc ja VP40 domeenid ning neid ühendav painduv linkerjärjestus. **B)** pQMCF-ZaireVLP-BlaM plasmid AhdI ja BstBI restriksioonisaatidega. **C)** nLucVP40 fragmendi kloneerimine pUC57-nLucVP40 plasmidist pQMCF-ZaireVLP-BlaM plasmidi AhdI ja BstBI restriksioonisaatide abil.

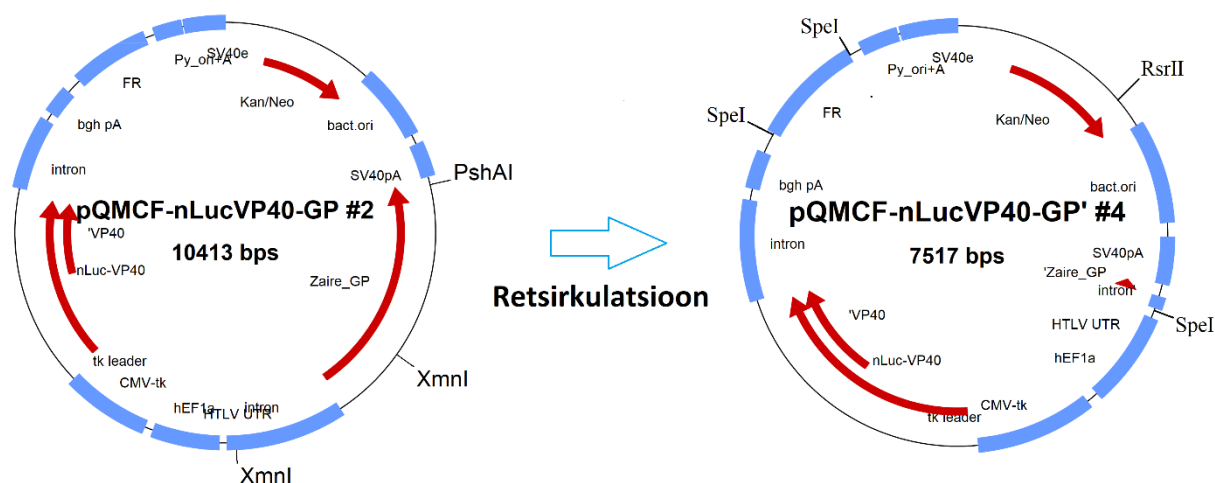
Vastavat kloneerimisel saadud plasmidi kontrolliti kahe restriksioonanalüüsiga. Esimesel restriksioonil kasutati Eco91I ning Bsp119I restriksionaase, millega saadi õige saadusele iseloomulikud DNA lõigud suurusega 9038, 900 ning 457. Teisel lõikusel kasutati Eam1105I ning SpeI restriksionaase, mille tulemusel tekkisid samuti eeldatavad DNA fragmendid 5857, 2168, 1758 ja 630 (Lisa 1). Seega kontroll kinnitas olemasoleva plasmidi õigsust ning tulemuseks oli edasisteks kloneerimisteks ning transfekterimisteks kasutatav plasmid pQMCF-nanolucVP40-GP (Joonis 6).



**Joonis 6.** pQMCF-nLucVP40-GP #2 plasmidi ülesehitus kontrollrestriktaaside saitidega (Eco91I, Bsp119I, Eam1105I, SpeI).

### 2.3.1.2. Pinnavalguta VLP-de ekspressioonivektori valmistamine

VLP-de pinnavalik-vahendatud sisenemise spetsiifilisuse üldiseks kontrolliks valmistasime ka vektori, mis ekspresseerib ainult VP40 ja puudub viiruselist pinnavaliku kodeeriv järjestus. Kuna on näidatud, et Ebola VLP-de sisenemine toimub GP valgu vahendusel, siis VLP ilma glükoproteiiniga ei tohiks siseneda rakkudesse viiruse sisenemisele omase mehhanismiga ning seega on sellega nakatamisel tekkiv nanolutsiferaasi aktiivsus nõ. mittespetsiifiline taustmüra. Sellise plasmidi konstrueerimiseks kasutati pQMCF-nLucVP40-GP #2 plasmidi, millest restriksiooni abil GP piirkond eemaldati (Joonis 7). Restriksioonil kasutati tõmpide otstega restriktase PshAI ja XmnI, mille tulemusel tekkisid DNA fragmendid pikkusega 7514, 1404, 1492 bp. GP-negatiivne (säilis vaid 52 aluspaari suurune GP cDNA c-terminaalne lõik) plasmid, mis nimetati pQMCF-nLucVP40-GP' #4, saadi 7514 pikkuse DNA lõigu (XmnI-PshAI), mis eelnevalt puhastati geelist, re-tsirkulariseerimisga. Valminud plasmidi kontrolliti restriktase RsrII ja SpeI abil, millega töötlemise tulemusena saadi õigele kloonile iseloomulikud DNA lõigud pikkustega 3926, 1660, 1301, 630 (Lisa 2).



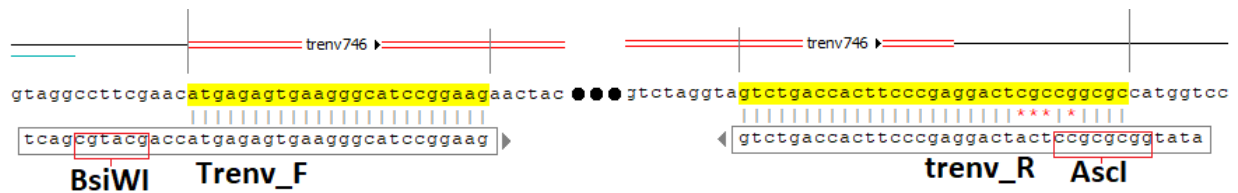
**Joonis 7.** pQMCF-nLucVP40-GP' #4 konstrueerimise skeem, kasutades pQMCF-nLucVP40-GP #2 plasmidi fragmenteerimist restriksiooniensüümidega PshAI ja XmnI ning suurima fragmendi retsirkulariseerimist. pQMCF-nLucVP40-GP' #4 plasmidil välja toodud ka kontrollrestriktaaside saidid (SpeI ja RsrII).

### 2.3.1.3. HIV-1 pinnavalku eksponeeriva VLP ekspressioonivektori valmistamine

Testsüsteemi loomise ajendiks oli selle kasutamine Zaire ja Sudan ebolaviiruse GP valgu vastaste antikehade, mis olid eelnevalt arendatud Icosagenis, iseloomustamiseks. Siiski lisaks otsustati süsteemi laiendada teisi viirusi neutraliseerivate agentide tuvastamiseks. Seega konstrueeriti ka vektorid, mille puhul pseudotüpeeritaks Ebola VP40 VLP-d heteroloogsete pinnavalkudega. Samuti oleks sellised heteroloogset pseudotüpeeritud VLP-d kasutatavad Ebola GP põhise sisenemise inhibeerimise spetsiifilisuse tõestamiseks. Üheks kasutatud heteroloogseks pinnavalguks oli HIV pinnavalk Env gp140 (gp120+gp41 prekursor, millel puudub tsütoplasmaatiline domeen). Selleks asendati pQMCF-nLucVP40-GP #2 plasmidis Zaire GP cDNA regiooniga, mis kodeerib HIV-1 B-klaadi konsensusjärjestusega Env prekursori varianti gp140 (ConBtrev). gp140 kodeeriv koodonoptimeeritud cDNA pärines plasmidist GTU8-trenv746#18 (FIT Biotech OY), milles gp140 kodeeriv piirkond on tähistatud kui trenv746 (*truncated Envelope at aa. 746*). See lõik kloonitati PCR abil. Disainiti praimerid trenv\_F (trenv forward) ja trenv\_R (trenv reverse) (Joonis 8), mille otstesse disainiti üleulatuvate otstega BsiWI ja AscI restriksioonisaidid. Kasutades matriitsina GTU8-trenv746#18 plasmidi, amplifitseeriti

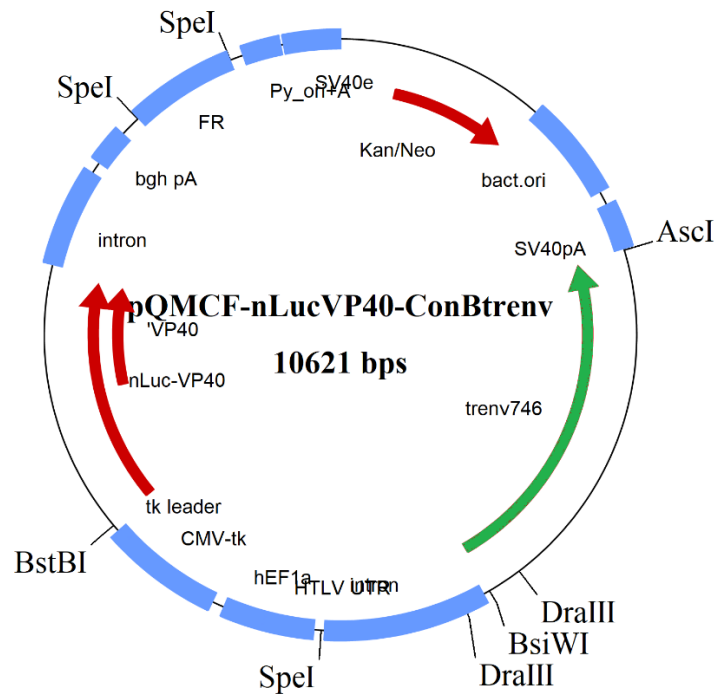


trenv746 kodeeriv saadus, mille otstesse moodustused on restriктаaside BsiWI ja AscI lõikamiskohad.



**Joonis 8.** BsiWI ja AscI restriksioonisaitidega praimerite TrenvF ja TrenvR seondumine GTU8-trenv746#18 plasmiidil.

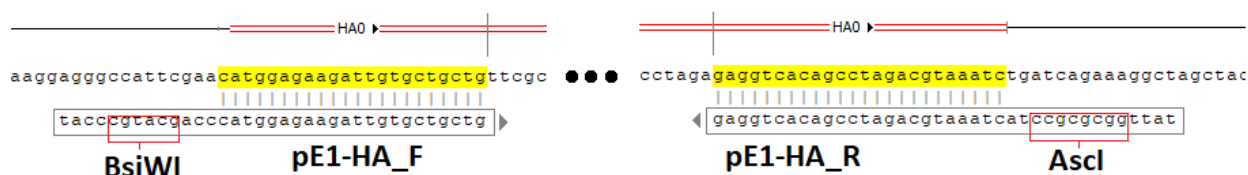
Tekkinud PCR-saadus puhastati ja töödeldi restriктаasidega BsiWI ja AscI ning see kloneeriti BsiWI/AscI avatud pQMCF-nLucVP40-GP #2 vektorisse Zaire GP piirkonna asemele. Seeläbi saadi uus, HIV gp140 pinnavalku tootev plasmiid pQMCF-nLucVP40-ConBtrenv #6 (Joonis 9). Valminud plasmidi kontrolliti kahe erineva restriksiooniga. Esimesel restriksioonil kasutati restriктаasi SpeI, millega töötlemise tulemusena saadi õigele kloonile iseloomulikud DNA lõigud pikkustega 6065, 3926 ja 630. Teisel restriksioonil kasutati restriктаase Bsp119I (BstBI) ja DraIII, millega töötlemise tulemusena saadi õigele kloonile iseloomulikud DNA lõigud pikkustega 8059, 2189 ja 373 (Lisa 3). Samuti kontrolliti PCR-ga amplifitseeritud ala sekveneerimisega.



**Joonis 9.** pQMCF-nLucVP40-ConBtrev plasmidi ülesehitus. Rohelisega on näidatud HIV Env kodeeriv cDNA. Välja toodud ka kontrollrestriktsaaside (SpeI, BstBI, Dra III) ja trenv 746 produkti sisestamiseks vajalikud restriksioonisaadid AscI ja BsiWI.

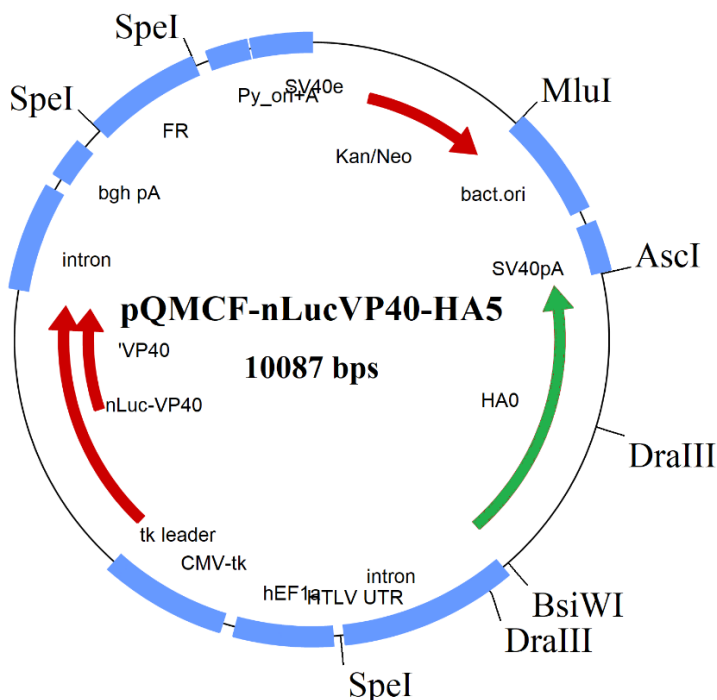
#### 2.3.1.4. Linnugripi H5 pinnavalku eksponeeriva VLP ekspressioonivektori valmistamine

Sarnaselt HIV pinnavalgule valmistati ka nLucVP40 VLP-de tootmiseks plasmid, mis ekspresseerib gripiviiruse pinnavalgu hemagglutiniini (hemagglutiniin 5) prekursorit. Selleks amplifitseeriti vastav kodeeriv piirkond plasmidist pE1H-HA#11 (FIT Biotech OY). PCR kloneerimiseks disainiti praimerid pE1-HA\_F (forward) ja pE1-HA\_R (reverse) koos üleulatuvate BsiWI ja AscI restriksioonisaadidega (Joonis 10). PCR-i saadust töödeldi BsiWI ja AscI restriksioonisaadidega. Kloneerimine teostati üldiselt, nagu on kirjeldatud HIV Env puhul eespool.



**Joonis 10.** BsiWI ja AscI restriksioonisaitidega praimerite pE1-HA\_F ja pE1-HA\_R seondumine plasmiidiga pE1H-HA .

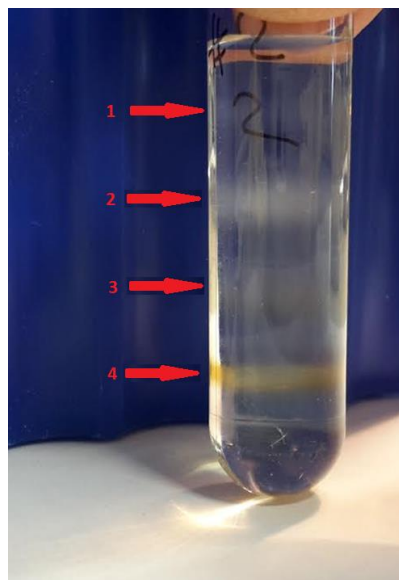
Saadi hemagglutiniini kodeerivat järjestust ekspresseeriv, VLP-sid tootev plasmiid pQMCF-nLucVP40-HA5 (Joonis 11). Valminud plasmidi kontrolliti kahe erineva restriksiooniga. Esimesel restriksioonil kasutati restriктаasi SpeI, millega töötlemise tulemusena saadi õigele kloonile iseloomulikud DNA lõigud pikkustega 5531, 3926 ja 630. Teisel restriksioonil kasutati restriктаase MluI ja DraIII, millega töötlemise tulemusena saadi õigele kloonile iseloomulikud DNA lõigud pikkustega 7245, 1788 ja 1054 (Lisa 4). Samuti kontrolliti PCR-ga amplifitseeritud ala sekveneerimisega.



**Joonis 11.** pQMCF-nLucVP40-HA5 plasmidi ülesehitus; rohelisega on näidatud koos PCR kloneerimisel saadud HA kodeeriv cDNA. Märgitud ka restriksionisaaidid BsiWI ja AscI ning kontrollrestriksiooni saidid MluI, DraIII ja SpeI.

### 2.3.2. Pseudotüpeeritud VLP-de tootmine imetajarakkudes

Järgnevalt kasutati konstrueeritud ekspressioonivektoreid pQMCF-nLucVP40-GP #2, pQMCF-nLucVP40-GP' #4, pQMCF-nLucVP40-ConBtrev #6, pQMCF-nLucVP40-HA5 #8 nanolutsiferaasi aktiivsuse ja viiruseliste pinnavalkudega pseudotüpeeritud VLP-de tootmiseks (vastavalt VP40\_GP, VP40\_GP-, VP40\_gp140 ja VP40\_HA5). Selleks transfekeeriti ekspressioonivektorid pQMCF rakuliini HEK293ALL. Transfektsioon viidi läbi kasutades rakku penetreeruva peptiidi - DNA kompleksile põhinevat keemilise transfektsiooni meetodit. Peptiidina kasutati toodet Reagent 007 (R007), mis on Icosagenis optimeeritud transfektsioonimeetod seerumvabas keskkonnas kasvavate imetajarakkude transfekeerimiseks (Karro 2015). Transfektsiooniprotsess teostati nagu on kirjeldatud peatükis 2.2.3. Seejärel koguti supernatant ning VLP-d sadestati ja puhastati, fraktsioneerides tsentrifuugimisega iodoksanooli gradiendis, nagu on kirjeldatud peatükis 2.2.4. Puhastamise tulemusel eristus neli erineva ujutihedusega visuaalselt eristatavat fraktsiooni (joonis 12), mis koguti.

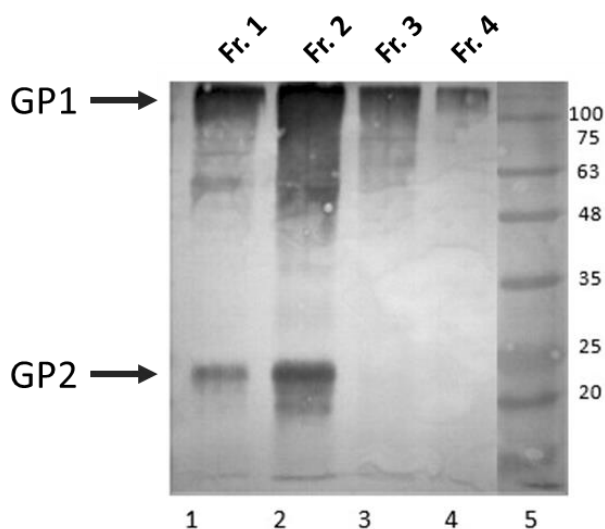


**Joonis 12.** Iodoksanooli gradiendis fraktsioneerimise tulemusena ilmnenud neli visuaalselt eristatavat fraktsiooni (märgitud punaste nooltega).

### 2.3.3. Pinnavalkude sisalduse määramine VLP fraktsioonides

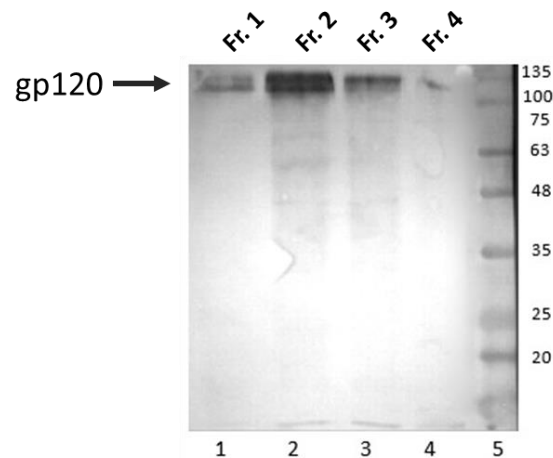
Peale fraktsioonide eraldamist määrati, millises fraktsioonis asetsevad huvipakkuvad VLP-d, millel on nanolutsiferaasi aktiivsus ning mis sisaldavad ka viiruselist pinnavalku. Pinnavalkude sisalduse määramine VLP neljas visuaalselt eristavas fraktsioonis teostati Western blot analüüsiga, kasutades erinevaid viiruse pinnavalkude (GP, HA ja gp140) vastaseid spetsiifilisi antikehi.

PQMCF-nLucVP40-GP #2 plasmiidist toodetud VLP Zaire GP pinnavalk on GP1/GP2 trimeeride heterodimeer, mis kasutatud redutseerivatel tingimustel (+DTT) laguneb, ning geelil lahutuvad GP1 ja GP2. Kasutatud polükloonne Zaire ebolaviiruse GP vastane antikeha seondub nii GP1 kui GP2-ga ning Western blot analüüsil olid tuvastatavad mõlemad domeenid: kus GP1 ~100 kDa juures ning GP2 20 kDa juures (joonis 13 rada 1 ja 2). Mõlema GP domeenid, eriti GP2 domeeni äratundmine viitab sellele, et toodetud on membraanseoseline pseudotüpeeritud VLP ning tegemist ei ole näiteks sekreteeritud sGP või GP1 domeeni kleepumisega VLP pinnale. Samuti on ilmne, et enamus GP-ga VLP-dest paiknevad fraktsioonis 2, kuna antikehade seondumine GP valgule on olnud tugevaim just seal (joonis 13, rada 2).



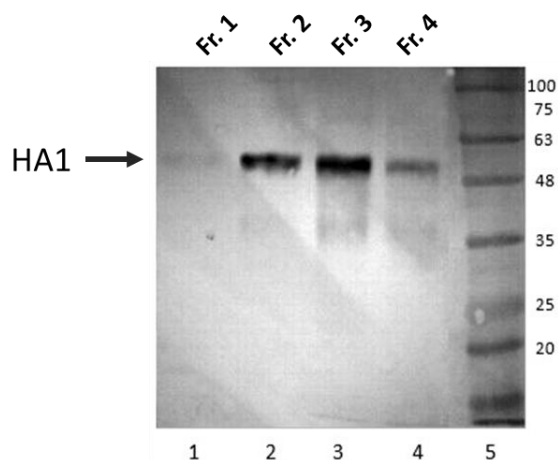
**Joonis 13.** VP40<sub>GP</sub> VLP fraktsioonide Western blot analüüs, kasutades küüliku polükloonsset antikeha, mis seondub Zaire ebolaviiruse GP1 ja GP2-ga. Rajad: **1**- Esimene fraktsioon. **2**- Teine fraktsioon. **3** – Kolmas fraktsioon. **4** – Neljas fraktsioon. **5** – Molekulmassi marker (kDa).

HIV pinnavalgu tuvastamiseks fraktsioonides kasutati Icosagenis arendatud küüliku polükloonset antikeha, mis seondub kasutatud HIV-1 Env gp120 domeeniga ning seega polnud membraanseoselise domeeni tuvastamine sellega võimalik. Glükosüülitud gp120 oli Western blot analüüsil tuvastatav (Joonis 14) ning tugevaim signaal oli samuti fraktsioonis 2, mis tähendab seda, et arvatavasti asetseb enamus VP40\_gp140 VLP-sid just selles fraktsioonis.



**Joonis 14.** VP40\_gp140 VLP fraktsioonide Western blot analüüs küüliku polükloonse antikehaga, mis seondub HIV gp120-ga. Rajad: **1**- Esimene fraktsioon. **2**- Teine fraktsioon. **3** – Kolmas fraktsioon. **4** – Neljas fraktsioon. **5** – Molekulmassi marker (kDa).

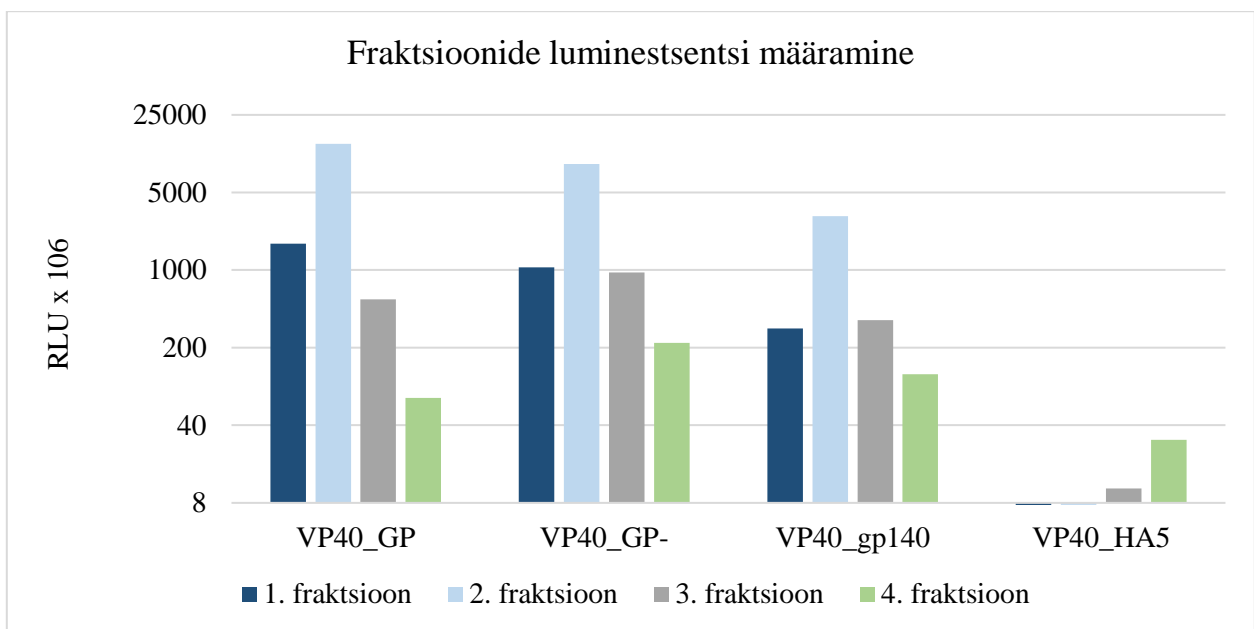
Gripiviiruse hemagglutiniini valgu tuvastamiseks kasutati küüliku polükloonset HA vastast antikeha (FIT Biotech). Hemagglutiniini prekursor protsessitakse küpseks trimeerseks pinnavalguks, mille iga monomeer koosneb kahest polüpeptiidist: globulaarne HA1 ja membraanseoseline HA2. Kasutatud antikeha seondub HA1 polüpeptiidiga. Analüüsis ilmnas, et 59 kDa suurune HA1 valgu olemasolu oli tuvastatav fraktsioonides 2, 3 ja 4 ning erinevalt GP ja gp140 tulemustest, oli tugevaim signaal fraktsioonis 3 (Joonis 15).



**Joonis 15.** VP40\_HA5 VLP fraktsioonide Western blot analüüs HA1 vastase küüliku polükloonse antikehaga. **1-** Esimene fraktsioon. **2-** Teine fraktsioon. **3** – Kolmas fraktsioon. **4** – Neljas fraktsioon. **5** – Molekulmassi marker (kDa).

#### 2.3.4. Puhastatud VLP-de lutsiferaasi aktiivsuse määramine

Samuti mõõdeti kõikides puhastamisel saadud fraktsioonides nanoluc aktiivsust, mida saab hiljem kasutada VLP-de rakku sisenemise tuvastamiseks ja mõõtmiseks. Nende tulemuste põhjal on näha, et VP40\_GP, VP40\_GP- ja VP40\_gp140 VLP-de lutsiferaasi aktiivsus on kõrgeim just teises fraktsioonis, milles oli ka tugevaim pinnavalgu signaal GP ja Env ko-ekspresseerimisel. Samas oli gripiviiruse pinnavalguga pseudotüpeeritud VLP-de fraktsioonide lutsiferaasi aktiivsus oluliselt madalam kui teistes proovides. (Joonis 16) See võiks osutada, et hemagglutiniini valk häirib VP40 VLP-de moodustamist, kuid moodustub partikulaarsne HA-sisaldusega materjal, mis gradiendis puhastamisel koguneb valdavalt kolmandasse fraktsiooni.



**Joonis 16.** VLP-de lutsiferaasse aktiivsuse määramine fraktsioonides 1, 2, 3 ja 4.

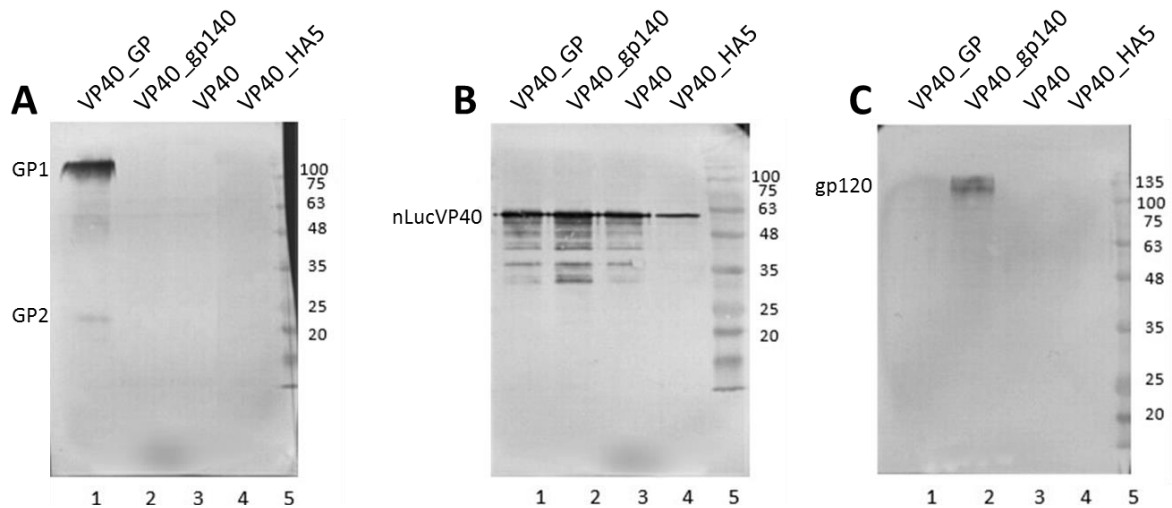
### 2.3.5. Edasiseks testimiseks valitud VLP-de kvaliteedi kontroll

Seega Fraktsioonide analüüsimine pinnavalkude spetsiifilise Western blot analüüsiga ning lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmised kinnitasid, et VP40\_GP, VP40\_GP- ja VP40\_gp140 VLP-de puhastamisel saadud fraktsioon 2 on kõige sobivam kasutamiseks edasistel uuringutel. Kuna VP40\_HA5 VLP nanolutsiferaasne aktiivsus oli oluliselt madalam ning pinnavalk ei kontsentreerunud samasse fraktsiooni kui teiste VLP-de puhul; seetõttu gripiviiruse HA valguga pseudotüpeeritud VLP-sid edasistesse uuringutesse ei kaastatud.

Lisaks, et kindel olla VLP-de puhtuses ning kinnitada pinnavalkude analüüsi spetsiifilisust, teostati teise fraktsiooni kogunenud VLP-materjalile ka spetsiifilisuse kontroll Western blot analüüsiga, kus iga VLP analüüsiti läbi kolme erineva pinnavalgu vastase antikehaga. Analüüsis kasutati samasid antikehasid, mis fraktsioonide määramiselgi Zaire GP1/2 vastane antikeha (Icosagen), HIV gp120 vastane antikeha (Icosagen) ning lisaks ka küüliku polükloonsed ebolaviiruse VP40 vastaste antikeha (IBT Bioservices). Analüüsi tulemuste põhjal kinnitati, et teise fraktsiooni VLP-d on puhtad ning nii GP kui HIV Env tuvastamisel saadi signaal vaid vastava valgu koekspressiooni korral (joonis 17A ja C). VLP-sid moodustav nLucVP40 valk tuvastati teises fraktsioonis kõigi VLP-de puhul. VP40 valgu suurus on 35 kDa ning meie poolt lisatud



nanolutsiferaasi valgu suurus on 19 kDa. See teeb eeldatava nLucVP40 valgukompleksi suuruseks 54 kDa. Küll aga on need kaks valku veel omakorda ühendatud linkeri abil, mis omakorda lisab ca 5 kDa veel juurde. Seetõttu on kogu valgujärjestuse suuruseks 59 kDa, mis ilmnes ka Western blotil (joonis 17B).



**Joonis 17.** Teisest fraktsioonist kogutud VLP-de Western blot analüüs pinnavalkude ja VP40 vastaste antikehadega. **A** - Zaire ebolaviiruse GP vastase antikehaga. **B** - VP40 vastase antikehaga. **C** - HIV gp120 vastase antikehaga. Rajad kõigil paneelidel: **1** – VP40\_GP. **2** – **3** – VP40 -. **4** – VP40\_HA5. **5** – Molekulmassi marker (kDa).

Kokkuvõtvalt võib öelda, et nanoluc aktiivsusega ebola VP40-VLP-de tootmine imetajarakkudes oli edukas, ja pseudotüpeerimine gripiviiruse hemagglutiniiniga. Lisaks pinnavalgu sisaldusele tõestati ka VLP-de lutsiferaasne aktiivsus. Algselt oli plaanis analüüsida toodetud VLP-sid ka massispektromeetria meetodiga rakuliste valkude koostise võrdlevaks analüüsiks, (näiteks võrreldes HIV Gag VLP-dega), ning elektronmikroskoopiaga morfoloogia kirjeldamiseks, kuid tehniliselt põhjustel seda ei õnnestunud teha.

### 2.3.6. Toodetud VLP-de sihtmärkrakkudesse sisenemise ja selle tuvastamise testimine

Järgnevalt testiti, kas toodetud ja puhastatud VLP-d on võimelised pinnavalgu seondumise kaudu rakkudesse sisenema. Kasutati ebolaviiruse GP ja HIV gp140 sisaldavate VLP-de ning ainult nLucVP40 ekspresseerimisel toodetud VLP-de fraktsiooni nr 2. Sihtmärkrakkudena kasutati erinevaid rakuliine:

1. Rohepärdiku rakuliin Vero E6, mis on väga vastuvõtlik Zaire ebola viiruse nakkusele ning laialt kasutatud filoviiruste uuringutes. (Björndal jt., 2003)
2. HeLa derivaat TZM-bl, mis ekspresseerib Env-ga interakteeruvaid ning HIV viiruse sisenemiseks vajalikke pinnaretseptoreid CCR5 ja CD4 (Wei jt., 2002). Seega on seda võimalik kasutada HIV-1 VLP Env-vahendatud sisenemise analüüsimiseks.
3. inimese rakuliin HeLa, mille puhul on näidatud ebola VLP-de sisenemist (Aleksandrowicz jt., 2011) ning mis toimib negatiivse kontrollina HIV Env VLP-de nakatamisel.

Rakkude nakatamisel VLP-dega on oluline teada VLP-de suhtelist kontsentratsiooni, et nakatada rakke sarnase VLP-de hulgaga, mis on hädavajalik efektiivsuse omavaheliseks võrdlemiseks. Selleks määrati erinevate VLP preparaatide totaalse valgu kontsentratsioonid Pierce BCA totaalse valgu määramise komplektiga. Edasistes katsetes lähtuti lahjenduste valmistamisel ja normaliseerimisel preparaatide totaalse valgu kontsentratsioonidest.

Seega, kasutada oli kolm rakuliini ning kolme tüüpi VLP-sid. Algse hüpoteesi kohaselt peaks pinnavalgu põhise nakatamise korral VP40\_GP sisenema kõikidesse valitud rakuliinidesse, mida kinnitaks nakatatud rakkudes tekkiv lutsiferaasi aktiivsus. VP40\_gp140 peaks olema võimeline sisenema ainult TZM-bl rakuliini, kuna ainult see rakk toodab vastavaid retseptoreid (CCR5 ja CD4) gp140-vahendatud infektsiooniks. VP40\_GP- aga ei oma üldse viiruselist pinnavalku rakku sisenemiseks ning on seega kõigi ülejäänute negatiivseks kontrolliks, mis aitab hinnata taustasignaali tugevust erinevates liinides.

Nakatamise katseid viidi läbi kokku neli, muutes erinevaid parameetreid. Selle eesmärgiks oli selgitada välja sobivaimad tingimused arendatava VLP-põhise neutraliseerivate ühendite analüüsiks. Nendes katsetes testiti:

1. erinevaid VLP-de kontsentratsioone (totaalse valgu mõõtmise põhjal)

2. erinevaid nakatamiskeskkondi, näiteks erinevat seerumi kontsentratsiooni kasvukeskkonnas, millel võib olla mõju nakatamise efektiivsusele (Qin jt., 2013).
3. Samuti hinnati näiteks VLP-de plastikule kleepumise efekti, et analüüsida valepositiivsete tulemuste põhjuseid.

Järgnevalt kirjeldatakse nelja läbi viidud nakatamise testi ja nendega saadud tulemusi.

#### **2.3.6.1. Esimene nakatamise test: VLP kontsentratsiooni ja seerumi mõju testimine**

Esmalt nakatati HeLa ja TZM-bl rakuliine, kasutades nende söötmetes erinevaid kontsentratsioone veise lootelist seerumit (FBS-i) - 1% ja 10%. Seda just selle tõttu, et aru saada seerumi mõjust nakatamise efektiivsusel ning GP ja gp140 vahendatud VLP-de sisenemistel vs mittespetsiifilisel kleepumisel. Rakkude optimaalseks kasvuks on küll vajalik 10% seerumi olemasolu, kuid lühiajaliselt (nt nakatamise ajaks) võib selle ka ära jätta või kontsentratsioone langetada.

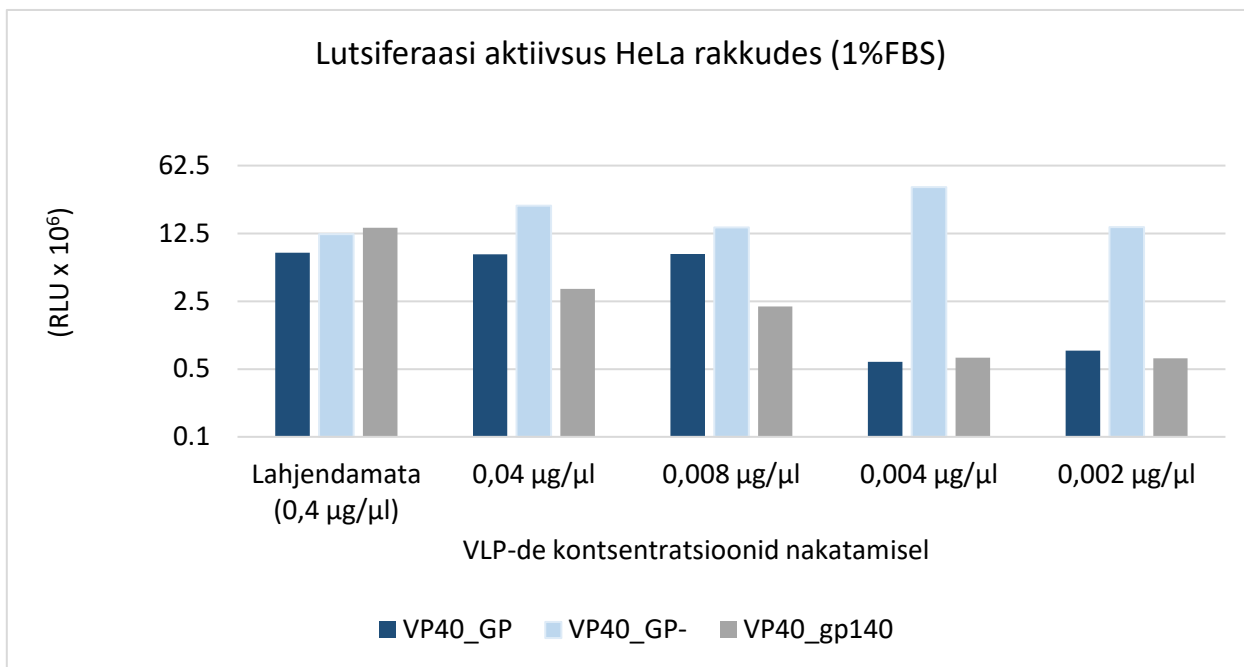
Samuti on vaja teada, milline on parim VLP-de kontsentratsioon arendatavas analüüsis kasutamiseks. Selle kriteerium võiks olla selgelt tuvastatav positiivne lutsiferaasi aktiivsus, mille puhul on maksimaalne erinevus mittespetsiifilise, pseudotüpeerivast valgust sõltumatu seondumise ja spetsiifilise signaali vahel. Selleks tehti VLP-de lahjendusi kokku 5: 0,4 µg/µl, 0,04 µg/µl, 0,008 µg/µl -, 0,004 µg/µl ja 0,002 µg/µl.

Järgnevalt toimus rakkude nakatamine VLP-dega ning luminesentsi mõõtmine nakatamise efektiivsuse mõõtmiseks. Rakkude nakatamine VLP-dega toimus nagu kirjeldatud peatükis 2.2.6 ning luminesentsi määrati nagu kirjeldatud peatükis 2.2.7.

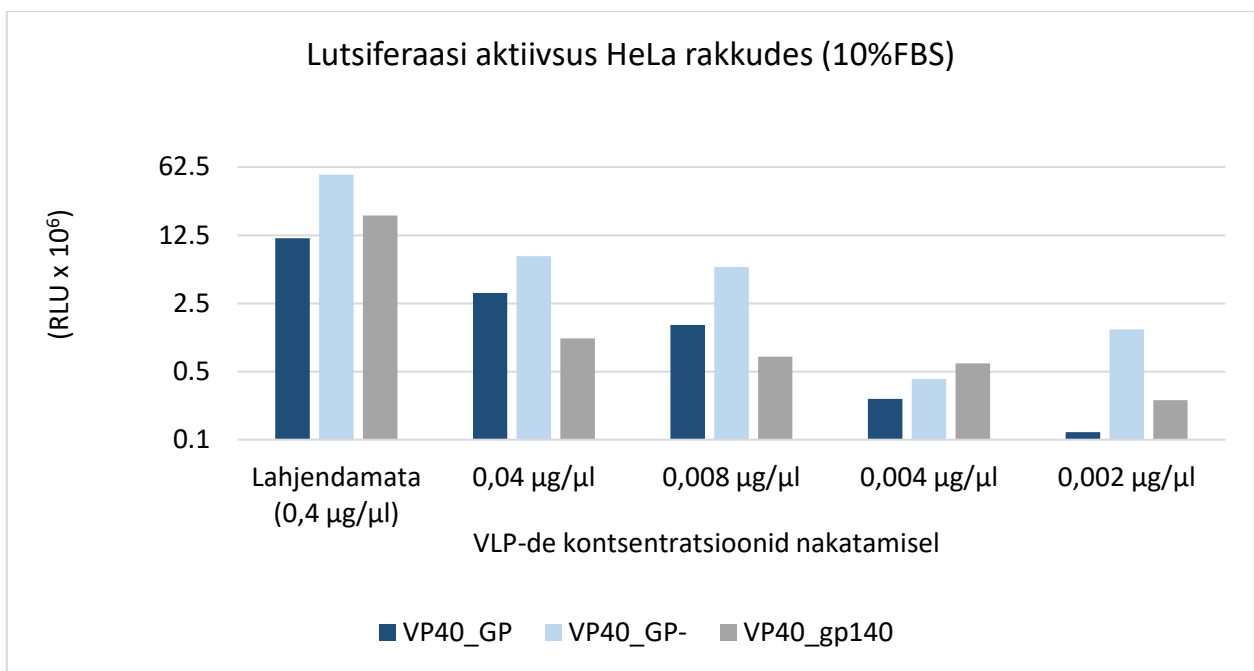
Esimese nakatamise testi tulemusel selgus:

- 1) HeLa rakkude puhul on märgata 1% FBS juuresolekul (joonis 18) suuremat nanolutsiferaasi aktiivsust madalate VLP kontsentratsioonide juures ning 10% FBS juuresolekul väiksemat nanolutsiferaasi aktiivsust (Joonis 19).
- 2) TZM-bl rakkude puhul on aga märgata vastupidist efekti, kus madalate VLP kontsentratsioonide juures on 10% FBS juuresolekul nanolutsiferaasi aktiivsus kõrgem (joonis 21) ning 1% FBS juures madalam (joonis 20).
- 3) VP40\_GP- VLP (negatiivne taustamüra kontroll) näitab suuremat nanolutsiferaasi aktiivsust mõlemas rakuliinis (Joonis 18, 19 ja 20), kui teised VLP-d.

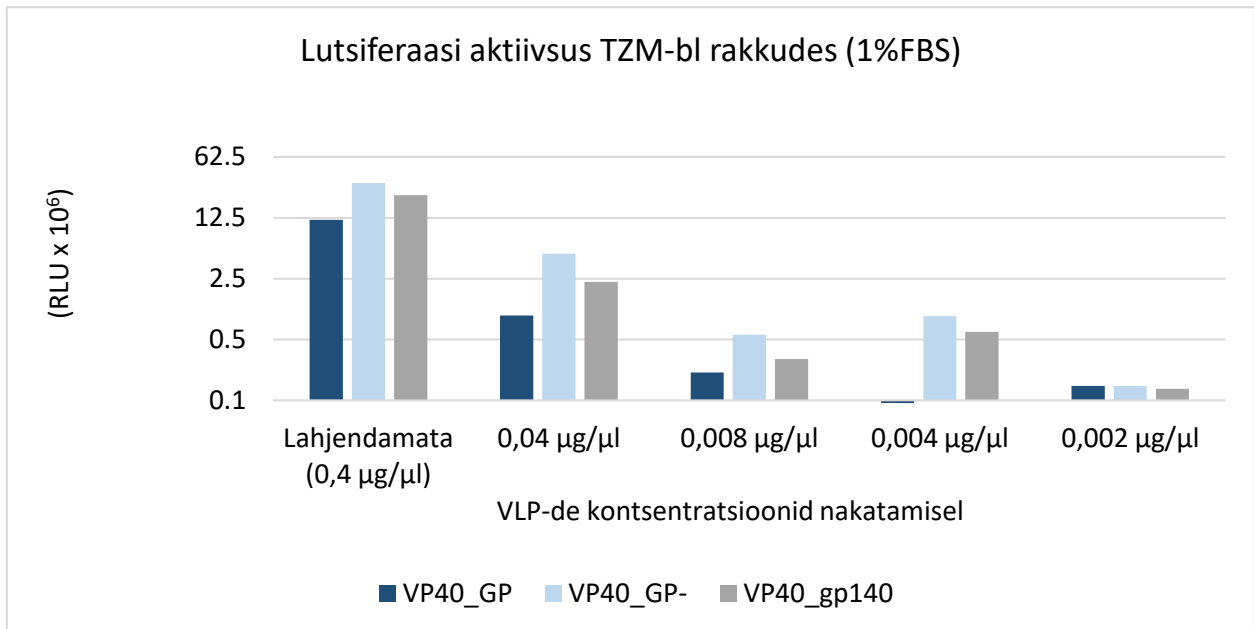
- 4) VP40\_gp140 VLP-l on tuvastatav kõrge nanolutsiferaasi aktiivsus ka HeLa rakuliinis, kuhu VLP sisenda saada ei tohiks retseptorite puudumise tõttu. (Joonis 18 ja 19)
- 5) Parima VLP kontsentratsiooni tuvastamine ei olnud võimalik VP40\_GP- VLP ebamäärselt kõrgete nanolutsiferaasi aktiivsuste ning kahes rakuliinis esinevate erinevuste tõttu.



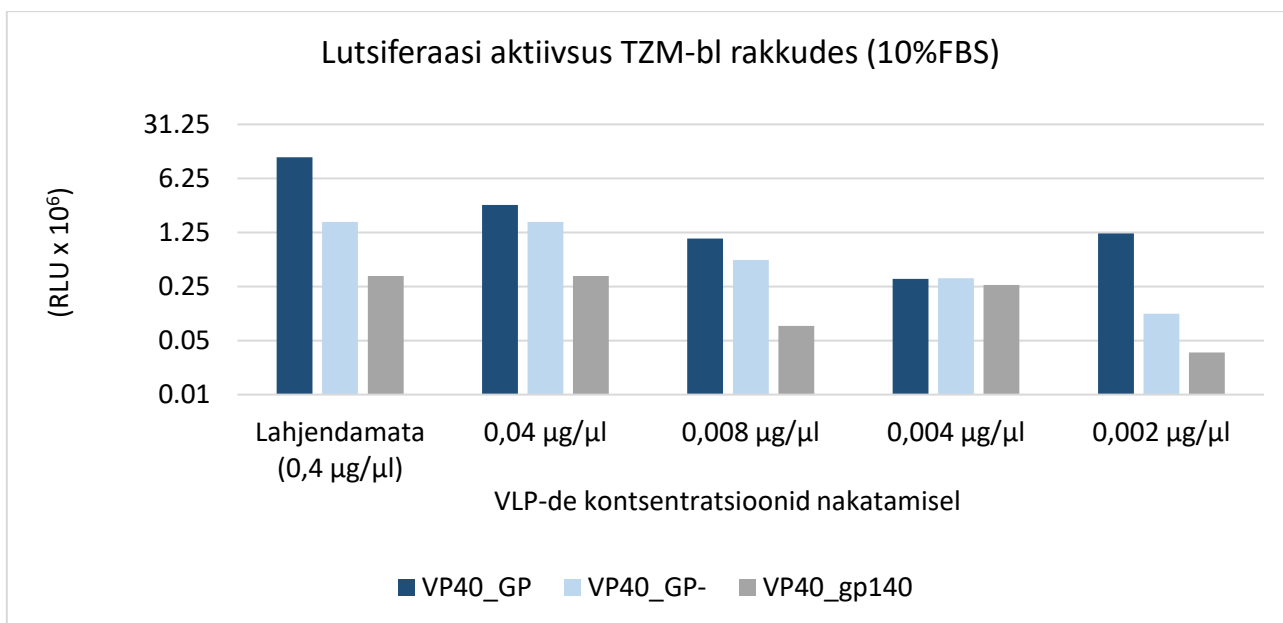
**Joonis 18.** Lutsiferaasi aktiivsus HeLa rakkude nakatamisel VP40\_GP, VP40\_GP- ja VP40\_gp140 VLP-dega 1%FBS juuresolekul



**Joonis 19.** Lutsiferaasi aktiivsus HeLa rakkude nakatamisel VP40\_GP, VP40\_GP- ja VP40\_gp140 VLP-dega 10%FBS juuresolekul



**Joonis 20.** Lutsiferaasi aktiivsus TZM-bl rakkude nakatamisel VP40\_GP, VP40\_GP- ja VP40\_gp140 VLP-dega 1%FBS juuresolekul



**Joonis 21.** Lutsiferaasi aktiivsus TZM-bl rakkude nakatamisel VP40\_GP, VP40\_GP- ja VP40\_gp140 VLP-dega 10%FBS juuresolekul

Seega esimese nakatamise testi tulemused erinesid oodatust ning oli selge, et sellisena ei ole toodetud VLP-d kasutatavad plaanitud viisil inhibiitorite analüüsimiseks. Suurimaks probleemiks oli spetsiifilisuse puudumine, mis ilmnis VP40\_GP- VLP-ga nakatamisel tekkiva kõrge nanolutsiferaasi aktiivsusega mõlemas kasutatud rakuliinis. Ilma pinnavalguta VLP ei tohiks olla võimeline sisenema rakkudesse ning isegi taustsignaali olemasolul peaks see olema madalam kui nt GP-positiivse VLP puhul. Samuti ei tohiks saada siseneda VP40\_gp140 VLP HeLa rakkudesse retseptorite puudumise tõttu ning ka see tulemus viitas, et sellisena pole meetod plaanitud eesmärgil kasutamiseks sobiv. VLP-de kontsentratsioonide erinevustel ei olnud märgata seost spetsiifilise nakatamise efektiivsusega kuna igal VLP kontsentratsioonil oli pinnavalguta VLP signaal kõrgeim. Samuti puudus ka selge erinevus seerumi kontsentratsioonidel nakatuvuse efektiivsusega. Tulemuste põhjuseid võib olla mitmeid ning seetõttu otsustati korrata katset, muutes mõningaid parameetreid ning kasutada filoviiruste uurimisel laialt kasutatavat rakuliini Vero E6.

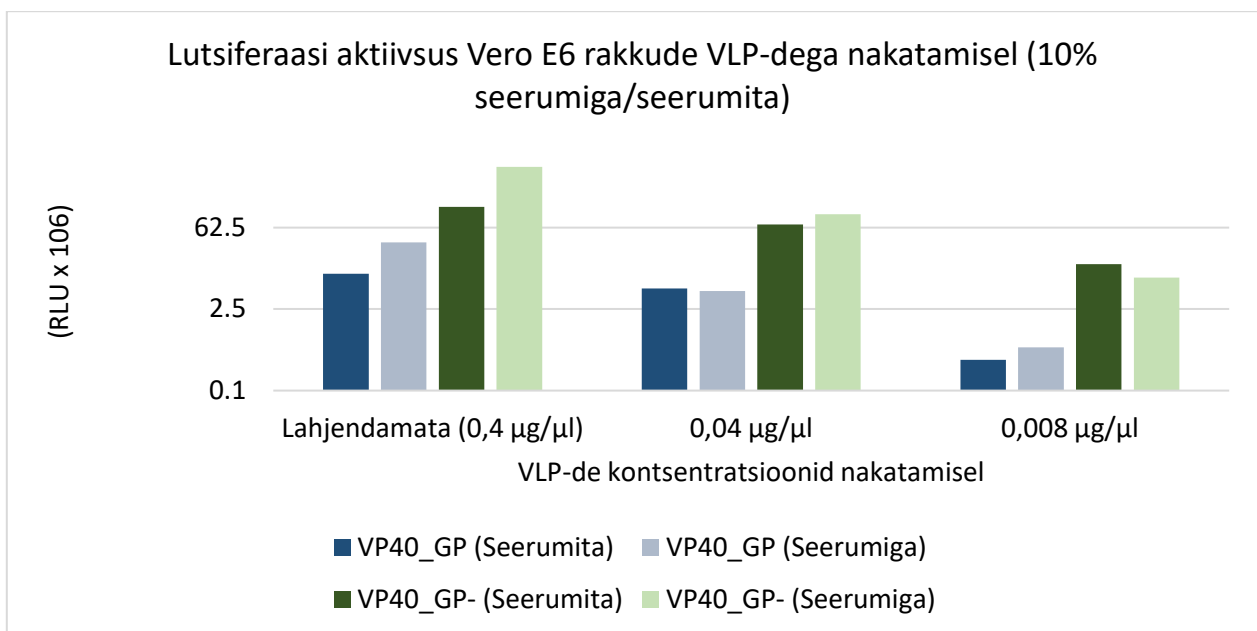
### **2.3.6.2. Teine nakatamise test: Vero E6 rakkude kasutamine ebola GP vahendatud sisenemise mõõtmiseks**

Kuna HeLa ja sellest pärinev TZM-bl rakuliinis saadud tulemused näitasid viiruse pinnavalguta VLP-de puhul kõrge taustsignaali olemasolu, otsustati järgnevalt testida VP40\_GP ja VP40\_GP-VLP-sid, kasutades teistsugust sihtmärkrakku. Selleks valiti filoviiruste uuringutes laialdaselt kasutatav rakuliin Vero E6 ning kontrolliks ka eelnevas katses kasutatud rakuliini TZM-bl. Samuti vaadeldi nakatamise efektiivsust seerumivabas keskkonnas, et näha kas eelnevad tulemused võivad olla seotud ka minimaalse (1%) seerumi sisaldusega kasvukeskkonnas. Nakatamisel kasutati järgneva VLP-de lahjendusi: 0,4 µg/µl, 0,04 µg/µl ja 0,008 µg/µl. Rakkude nakatamine ja nanolutsiferaasi aktiivsuste mõõtmine toimus sarnasel eelnevale nakatamisele.

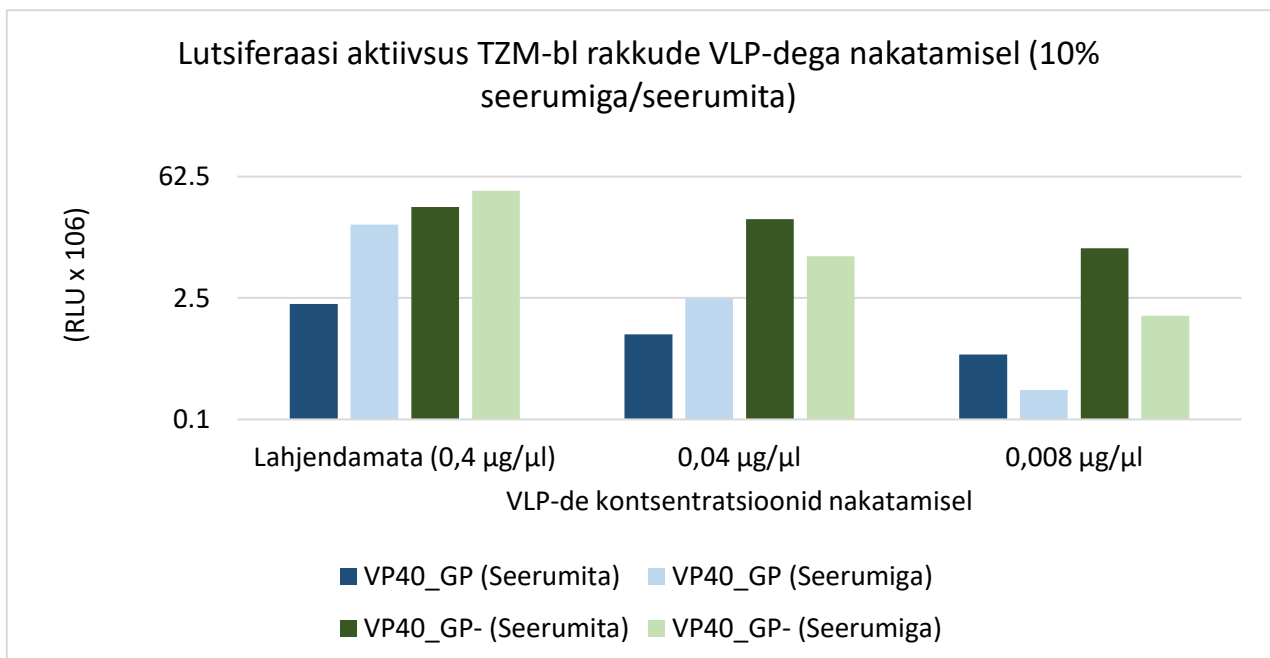
Kokkuvõttes selle katse tulemused (joonised 22 ja 23) näitasid:

- 1) sarnaselt eelmisele katsele oli mõlemas rakuliinis pinnavalguta VLP-de puhul lutsiferaasi aktiivsus suurem (joonised 22 ja 23).
- 2) Seerumi puudumine või olemasolu ei muuda oluliselt signaali tugevust ega spetsiifilisust.
- 3) Madalaimal kasutatud VLP kontsentratsioonil (0,008 µg/µl) on lutsiferaasi aktiivsus tugev, kuid spetsiifilisus kontsentratsiooni vähendamisega ei suurene.

Kuna kvalitatiivseid muutusi võrreldes eelmise katsega ei ilmnenud, võis järeldada, et mittespetsiifisus pole tingitud HeLa liini kasutamisest. Tulemuste selgituseks võib pakkuda kahte võimalust. Esiteks, 293ALL süsteemis toodetud VLP-de omadused (morfoloogia, valguline koostis) tingivad nende ebatavalise käitumise/sisenemise või VP40\_GP-VLP-d kleepuvad tugevalt 96 süvendiga plaadile või rakkudele, tekitades lutsiferaasse aktiivsuse ka ilma rakku tegelikult sisenemata. Kuna elektronmikroskoopia analüüsi VLP-dele pole tehtud, ei ole ka katse andmeid nende suuruse, morfoloogia ja selle erinevuste kohta. Järgnevalt vaadeldi VLP-de kleepumise võimalust 96-süvendiga plaatide või rakkude pinnale.



**Joonis 22.** Lutsiferaasi aktiivsus Vero E6 rakkude nakatamisel VP40\_GP, VP40\_GP- VLP-dega 10% FBS juuresolekul ja ilma.



**Joonis 23.** Lutsiferaasi aktiivsus TZM-bl rakkude nakatamisel VP40\_GP, VP40\_GP- VLP-dega 10% FBS juuresolekul ja ilma.



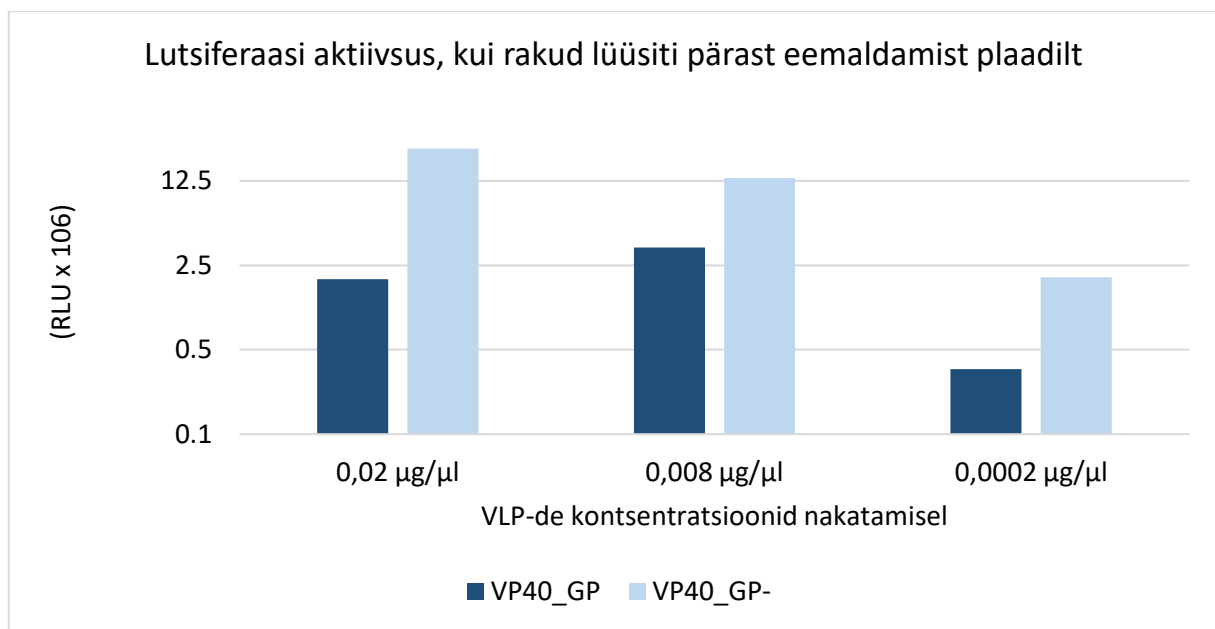
### 2.3.6.3. Kolmas test: mittespetsiifiline kleepumine vs. rakku sisenemine

Kuna ilma GP-ta VLP luminesentsi signaal oli kõigil katsetingimustel alati kõrgem kui pseudotüpeeritud VP40\_GP VLP-l, siis järgmiseks otsustati uurida, kas põhjus võib olla VP40-VLPde mittespetsiifilise kleepumisega plastiku ja/või rakkude pinnale, mis võib varjutada pinnavalgu spetsiifilise seondumise signaalid. Seega kujundati uus katse, kus kasutati ainult Vero E6 rakke ning DMEM keskkonda 10% FBS-i lisandiga, mis on nende rakkude kasvatamisel kasutatav tavapärane seerumi sisaldus. Nakatamisel kasutatavate VLP-de kontsentratsioonidega mindi veel allapoole: 0,02 µg/µl, 0,008 µg/µl ja 0,0002 µg/µl, kuna eelnevates katsetes on näidatud suhteliselt tugevaid signaale ka madalaimal kasutatud kontsentratsioonil (0,008 µg/µl). Inkubeerimine toimus sarnaselt eelnevatele katsetele kuid rakke töödeldi kahel erineval viisil. Mõlemal juhul pesti pärast nakatamist 4 korda PBS-ga süvendites, nagu eelnevates testides. Ühe paralleeli puhul lüüsi rakud seejärel otse süvendites, (nagu eelnevalt) kuid teisel juhul eemaldati rakud süvenditest trüpsiiniga, koguti tsentrifuugides ja lüüsi seejärel nanoLuc substraati sisaldava lüüsilahusega. Eeldati, et viimasel viisil toimides võiks väheneda rakkudele/plastikule kleepunud VLP-de hulk lüsaadis.

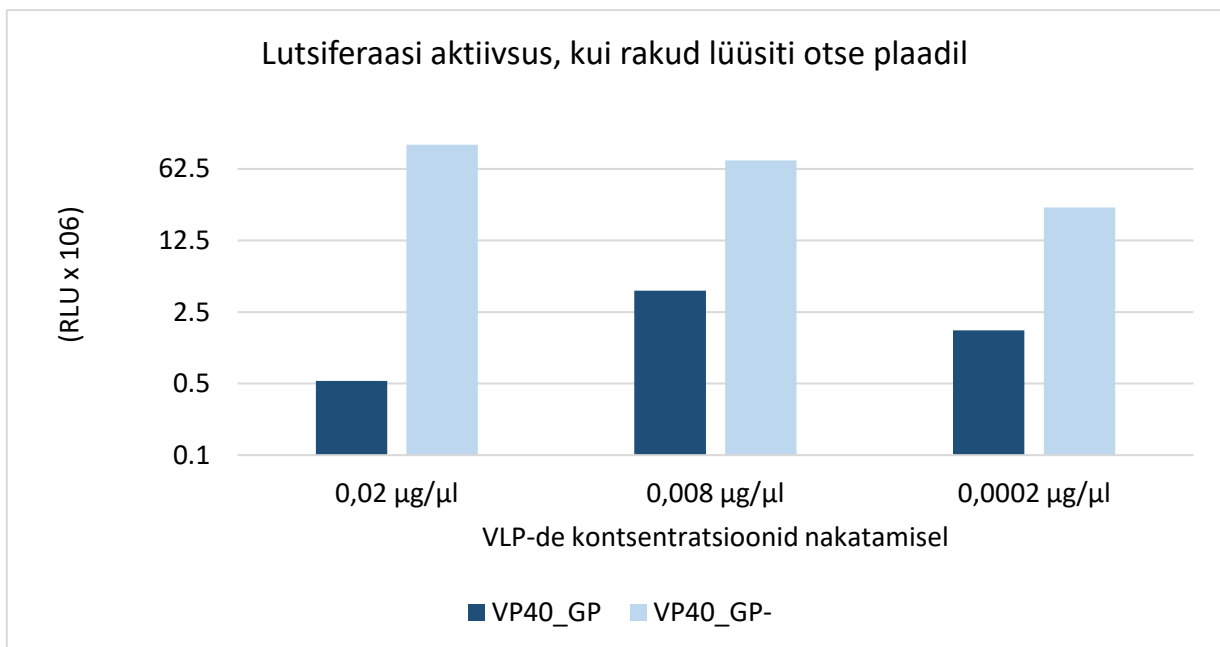
Tulemused on esitatud joonistel 24 ja 25 ning nendest ilmneb, et:

1. Mõlema meetodi puhul on pinnavalguta VP40\_GP- VLP signaalid tugevamad.
2. Ka kontsentratsiooni langetamine 0.0002 µg/µl ei tekita kvalitatiivset muutust vaid üldist signaalitugevuse langemist.

See tulemus näitas, et ootamatu tulemuse põhjus pole GP- VLP-de suurem kleepumine plastikule vaid pigem viiruse pinnavalgust sõltumatu sisenemine rakkudesse või tugeva kleepumisega rakkude pinnale, mida trüpsiiniga töötlemine ega PBS-ga pesemine ei eemalda. Sega pole sellised VLP-d kasutatavad plaanitud meetodi arendamiseks viirusnakkuse inhibiitorite leidmiseks ja kirjeldamiseks nanolutsiferaasi aktiivsuse mõõtmise abil. Viimase õlekõrrena otsustati toota ja valmistada täiesti uued VLP preparaadid ning testida nende nakatamise võimet, et välistada VLP tootmise ja puhastamisega seotud ebaselge põhjus.



**Joonis 24.** Lutsiferaasi aktiivsuste mõõtmine Vero E6 rakkude nakatamisel 10% FBS juuresolekul. Luminestsents mõõdetud rakkude eemaldamisel 96-süvendiga plaadilt.

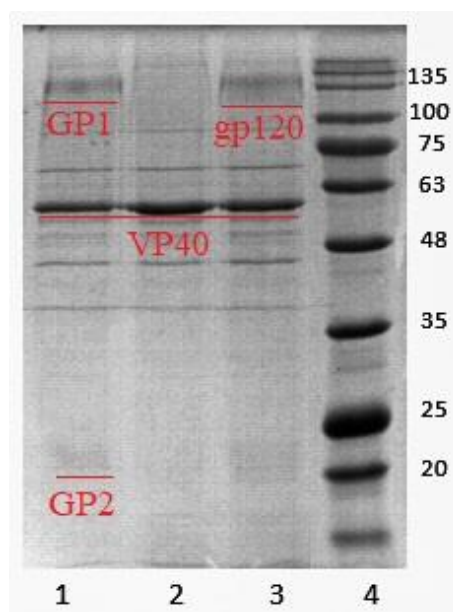


**Joonis 25.** Lutsiferaasi aktiivsuste mõõtmine Vero E6 rakkude nakatamisel 10% FBS juuresolekul. Luminestsents mõõdetud, lüüsidest otse 96-süvendi plaadil.

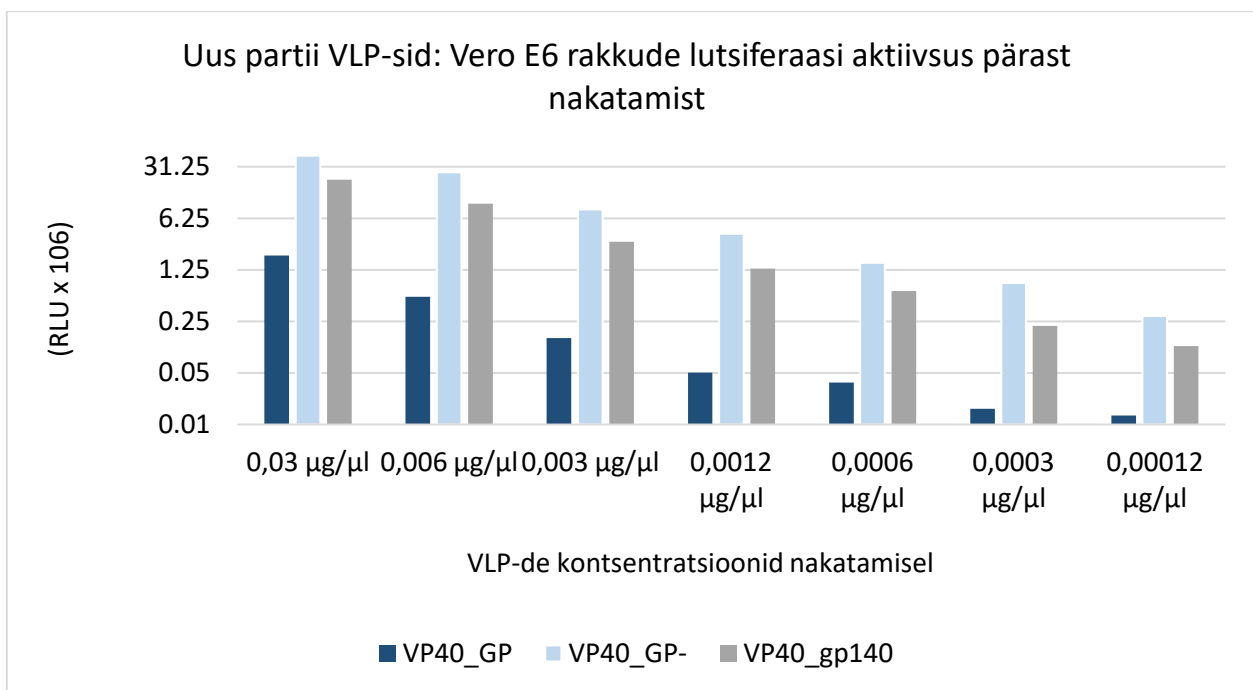
#### 2.3.6.4. Neljas nakatamise test: uus partii VLP-sid

Eelnevad testid olid näidanud kõik, et pinnavalguta VP40 VLP siseneks justkui kõige efektiivsemalt rakkudesse. Välistamaks tehnilisi põhjuseid ja kordamaks katset, otsustati toota täiesti uued VLP-d. Uued VLP-d toodeti sarnaselt, nagu eelmine partii, kuid neid kontrolliti seekord Coomassie värvimisega, millel on näha VP40 ja pinnavalgud (sh GP mõlemad domeenid GP1 ja GP2) (joonis 26). Uute VLP-de totaalse valgu kontsentratsioonid mõõdeti BCA analüüsiga, nagu eelmise partii puhul.

Uute VLP-de puhastamisel, kontrollimisel ja Vero E6 rakkude nakatamisel selgus aga, et tulemused ei erinenud eelnevatest katsetest. Signaal oli kõigil kasutatud VLP kontsentratsioonidel suurem GP-negatiivse ja VP40\_gp140 VLP (mis Vero E6 rakkudesse siseneda ei tohiks saada retseptorite puudumise tõttu) puhul võrreldes GP+ VLP-ga (joonis 27). Seega sisuliselt kordus eelmise partiiga saadud tulemus, mis näitab mitte viirusele sarnast nakatamist vaid pigem VLP-de mittespetsiifilist rakkudega seondumist, mida inhibeerib ebola viiruse pinnavalgu GP kuid mitte HIV gp140 eksponeerimine.



**Joonis 26.** Uute toodetud VLP-de (VP40\_GP, VP40\_GP-, VP40\_gp140) kontroll Coomassie värvimisega. Geelile laetud 2 µg VLP-d. **1** – VP40\_GP, **2** – VP40\_GP-, **3** – VP40\_gp140, **4** – molekulmassi marker (kDa)



**Joonis 27.** Uuesti toodetud VLP-de nanoluc aktiivsuste mõõdud Vero E6 rakkude nakatamisel.

Tuginedes saadud tulemustele, otsustasime nende nLucVP40 VLP-dega analüüsisüsteemi arendamist mitte edasi jätkata. Ootamatute tulemuste põhjuseid võib olla palju erinevaid. Üheks põhjuseks võib olla meie poolt lisatud nanolutsiferaasi molekuli lisamine VP40 struktuuri osasse. Kuna põhimõtteliselt muudeti natiivset VP40 molekuli väikese, kuid siiski lisavalguga, võib potentsiaalselt muuta see VLP omadusi nii rakkudesse sisenemisel, kui ka VLP struktuuri stabiilsust. Võib olla ka võimalik, et meie toodetud pseudotüpeeritud VLP-d küll on stabiilsed, aga nende aberrantne või ebaühtlane morfoloogia põhjustab mittespetsiifilisi efekte. Teoreetiliselt võib ka GP valguga eksponeerimine VP40 VLP pinnal olla häiritud nanolutsiferaasi domeeni poolt. Samas pole sarnaseid tulemusi täheldatud suuremate valkude lisamisel VP40 koosseisu ( $\beta$ -laktamaas, jaanimardika lutsiferaas), mis omakorda muudab selle hüpoteesi kaheldavaks. Täiendavaks kontrolliks ja uute lahenduste leidmiseks on valmimisel teist tüüpi VLP-de tootmisvektorid, milles kasutatakse maatriksivalguna HIV gag valku, millega on linkeri kaudu ühendatud nanolutsiferaas.

# KOKKUVÕTE

Ohtlike viiruste, nagu näiteks Ebola ja HIV vastaste ravimite toomine on olnud eesmärgiks nende avastamisest saati. Selliste viirustega töötamine sisaldab ohtusid ja on tugevalt reguleeritud, mis muudab katsete läbiviimise kalliks ja keerukaks. Selle tõttu on, näiteks viirusevastaste ühendite tuvastamiseks ja kirjeldamiseks kasulik rakendada viirust mimikeerivaid viiruselaadseid partikleid, mille tootmine ja modifitseerimine on palju lihtsam. Samas on sellistes VLP-põhistes analüüsides vaja kasutada spetsiifilisi, tundlikke, kvantiteeritavaid ja suure läbilaskvusega testideks sobivaid (ning eelistatavalt vähekulukaid) reportereid, mille kaudu saab ravimikandidaatide efektiivsust mõõta. Käesolevas töö eesmärgiks oli luua ebola VP40 VLP põhine meetod viirusnakkuse inhibiitorite leidmiseks ja kirjeldamiseks nanolutsiferaasi aktiivsusega viiruslaadsete partiklite abil. Käesolevas töös:

1. Kujundati nanolutsiferaasi ja ebolaviiruse VP40 liitvalgu põhine süsteem VLP-de tootmiseks imetajaraku kultuuris
2. Valmistati vastavad VLP tootmisvektorid kasutades Icosagen QMCF tehnoloogiat;
3. Toodeti ning puhastati viiruseliste pinnavalkudega (ebolaviiruse GP ja HIV Env) pseudotüpeeritud VLP-d
4. Testiti toodetud VLP-de nakatamisvõimet ja sobivust viirusnakkuse inhibiitorite analüüsisüsteemi jaoks

Nanolutsiferaasi aktiivsuste mõõtmistel aga selgus, et loodav analüüsisüsteem ei käitu nii, nagu eeldati. Ilma pinnavalguta VLP, mis rakkudesse sisenema ei peaks ning oli katsetes negatiivseks kontrolliks, andis rakkude nakatamisel tugevamaid signaale. Kuna selline nõ taustmüra varjutab võimalikud spetsiifilised signaalid, pole meetod kasutatav potentsiaalsete ravimikandidaatide leidmiseks. Põhjuseid ebaõnnestumisele võib olla mitmeid, kuid tõenäolisemaks võib pidada VP40 maatriksivalgu tugevat kleepumise efekti raku pinnal. Selle tõttu otsustati meetodi arendus peatada ning asuda otsima teistsuguseid lahendusi vajadustele vastava meetodi loomiseks.

Ka ebaõnnestumine käib teaduse juurde ning alati ei pruugigi jõuda soovitud tulemusteni. Kuigi antud töö raames soovitud testsüsteemi loomine ei õnnestunud, on saadud tulemusi võimalik kasutada edasises arendustöös. Samuti on antud töö raames saadud väärtuslikku teavet võimalik kasutada VLP-de tootmise ja puhastamise optimeerimiseks.

## SUMMARY

Since the discovery of Marburg virus and its relative ebolavirus, the need for vaccine or a therapeutic agent against this pathogen is still being searched. There are many ways to achieve this goal, but the most reliable way would be to work with a real virus. This type of research however demands high regulations and is very costly. Thus, a more convenient and less expensive methods are needed to deal with this pathogen. A virus-like particle (VLP) based assays are a possible solution to the problem. Virus-like particles are non-infective complexes of protein that resemble an authentic virus both as in structure and amino acid sequence. They lack the genetic material to produce copies of itself, therefore rendering it harmless. It is an easy way to work with an otherwise fatal virus. Our primary goal is to generate these virus-like particles to find neutralizing antibodies against all ebolavirus species.

In this thesis we produced virus-like particles of ebolavirus, mainly by using its matrix protein VP40. This protein can form virus-like particles on its own and bud the cell like a regular virus. Although, to study this virus certain additional molecules are required. Authentic ebolavirus also carries with it a glycoprotein on the surface which is essential for viral attachment and entry. With this glycoprotein and matrix protein VP40 we could produce VLP-s that can infect the cell without reproducing. To assess the possible neutralizing activity of an antibody however, we fused a small luciferase reporter molecule to the VP40 matrix protein, called nanoluciferase. This reporter-molecule can produce a measurable luminescence signal which upon potential viral neutralization, can be detected and quantified.

This thesis focused on producing VLP-s and measuring their ability to emit luminescence signal upon infecting cells. Due to unexpected behaviors of the generated VLP-s we did not get to detect any potential neutralizing antibody but did manage to get VLP-s to infect cells and emit signal. Produced signals however, did not correlate in an expected way. This led us to believe that our method could not be used for the purpose we created it. This long process is not the end of creating a reliable method for detecting possible drug candidates. A new similar project is already going which unfortunately will not be discussed in this thesis.

## KIRJANDUSE LOETELU

1. Aleksandrowicz, P., A. Marzi, N. Biedenkopf, N. Beimforde, S. Becker, T. Hoenen, H. Feldmann & H.-J. Schnittler (2011). "Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis." The Journal of infectious diseases **204**(suppl\_3): S957-S967.
2. Bamberg, S., L. Kolesnikova, P. Möller, H.-D. Klenk & S. Becker (2005). "VP24 of Marburg virus influences formation of infectious particles." Journal of virology **79**(21): 13421-13433.
3. Barré-Sinoussi, F., J.-C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vézinet-Brun & C. Rouzioux (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 868-871.
4. Bavari, S., C. M. Bosio, E. Wiegand, G. Ruthel, A. B. Will, T. W. Geisbert, M. Hevey, C. Schmaljohn, A. Schmaljohn & M. J. Aman (2002). "Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses." Journal of Experimental Medicine **195**(5): 593-602.
5. Baxter, D. (2007). "Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing." Occup Med (Lond) **57**(8): 552-556.
6. Becker, S., C. Rinne, U. Hofsäss, H.-D. Klenk & E. Mühlberger (1998). "Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins." Virology **249**(2): 406-417.
7. Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov & P. E. Bourne (2000). "The Protein Data Bank." Nucleic Acids Research **28**(1): 235-242.
8. Björndal, A. S., L. Szekely & F. Elgh (2003). "Ebola virus infection inversely correlates with the overall expression levels of promyelocytic leukaemia (PML) protein in cultured cells." BMC microbiology **3**(1): 6.
9. Carette, J. E., M. Raaben, A. C. Wong, A. S. Herbert, G. Obernosterer, N. Mulherkar, A. I. Kuehne, P. J. Kranzusch, A. M. Griffin & G. Ruthel (2011). "Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann–Pick C1." Nature **477**(7364): 340.
10. Chen, X. S., G. Casini, S. C. Harrison & R. L. Garcea (2001). "Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L11." Journal of molecular biology **307**(1): 173-182.
11. Cook, J. D. & J. E. Lee (2013). "The secret life of viral entry glycoproteins: moonlighting in immune evasion." PLoS pathogens **9**(5): e1003258.
12. Derdeyn, C. A., J. M. Decker, J. N. Sfakianos, X. Wu, W. A. O'Brien, L. Ratner, J. C. Kappes, G. M. Shaw & E. Hunter (2000). "Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120." J Virol **74**(18): 8358-8367.
13. Dixon, A. S., M. K. Schwinn, M. P. Hall, K. Zimmerman, P. Otto, T. H. Lubben, B. L. Butler, B. F. Binkowski, T. Machleidt & T. A. Kirkland (2015). "NanoLuc

- complementation reporter optimized for accurate measurement of protein interactions in cells." ACS chemical biology **11**(2): 400-408.
14. Earley, E. & K. Johnson (1988). "Vero cells: origin, properties and biomedical applications." Department of Microbiology School of Medicine Chiba University: pp.26-29.
  15. Engvall, E. & P. Perlmann (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." Immunochemistry **8**(9): 871-874.
  16. Feldmann, H., S. Jones, H.-D. Klenk & H.-J. Schnittler (2003). "Ebola virus: from discovery to vaccine." Nature Reviews Immunology **3**(8): 677.
  17. Feldmann, H., V. Volchkov, V. Volchkova & H.-D. Klenk (1999). The glycoproteins of Marburg and Ebola virus and their potential roles in pathogenesis. 100 Years of Virology, Springer: 159-169.
  18. Feldmann, H., C. Will, M. Schikore, W. Slenczka & H.-D. Klenk (1991). "Glycosylation and oligomerization of the spike protein of Marburg virus." Virology **182**(1): 353-356.
  19. Furuyama, W., A. Marzi, A. Nanbo, E. Haddock, J. Maruyama, H. Miyamoto, M. Igarashi, R. Yoshida, O. Noyori & H. Feldmann (2016). "Discovery of an antibody for pan-ebolavirus therapy." Scientific reports **6**: 20514.
  20. Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl & S. Zolla-Pazner (1983). "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 865-867.
  21. Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell & R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.
  22. Group, P. I. W. (2016). "A randomized, controlled trial of ZMapp for Ebola virus infection." New England Journal of Medicine **375**(15): 1448-1456.
  23. Hall, M. P., J. Unch, B. F. Binkowski, M. P. Valley, B. L. Butler, M. G. Wood, P. Otto, K. Zimmerman, G. Vidugiris & T. Machleidt (2012). "Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate." ACS chemical biology **7**(11): 1848-1857.
  24. Haynes, J. R., J. Cunningham, A. Von Seefried, M. Lennick, R. T. Garvin & S.-H. Shen (1986). "Development of a Genetically–Engineered, Candidate Polio Vaccine Employing the Self–Assembling Properties of the Tobacco Mosaic Virus Coat Protein." Nature Biotechnology **4**(7): 637.
  25. Hirst, G. K. (1942). "The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination." Journal of Experimental Medicine **75**(1): 49-64.
  26. Hoenen, T., A. Groseth & H. Feldmann (2012). "Current ebola vaccines." Expert opinion on biological therapy **12**(7): 859-872.
  27. Horlock, C. (2016). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)." Hg. v. British Society for Immunology. Imperial College London, UK. Online verfügbar unter <http://bitesized.immunology.org/experimental-techniques/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa>.



28. Hunter, E. & R. Swanstrom (1990). Retrovirus envelope glycoproteins. Retroviruses, Springer: 187-253.
29. Jackson, J. B. (1990). "The polymerase chain reaction in transfusion medicine." Transfusion **30**(1): 51-57.
30. Joshi, S. B., R. E. Dutch & R. A. Lamb (1998). "A core trimer of the paramyxovirus fusion protein: parallels to influenza virus hemagglutinin and HIV-1 gp41." Virology **248**(1): 20-34.
31. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680.
32. Lee, J. E., M. L. Fusco, A. J. Hessel, W. B. Oswald, D. R. Burton & E. O. Saphire (2008). "Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor." Nature **454**(7201): 177.
33. Leland, D. S. & C. C. Ginocchio (2007). "Role of cell culture for virus detection in the age of technology." Clinical microbiology reviews **20**(1): 49-78.
34. Li, D., T. Chen, Y. Hu, Y. Zhou, Q. Liu, D. Zhou, X. Jin & Z. Huang (2016). "An Ebola virus-like particle-based reporter system enables evaluation of antiviral drugs in vivo under non-biosafety Level 4 conditions." Journal of virology **90**(19): 8720-8728.
35. Li, H.-Y., J.-F. Han, C.-F. Qin & R. Chen (2013). "Virus-like particles for enterovirus 71 produced from *Saccharomyces cerevisiae* potently elicits protective immune responses in mice." Vaccine **31**(32): 3281-3287.
36. Lua, L. H., N. K. Connors, F. Sainsbury, Y. P. Chuan, N. Wibowo & A. P. Middelberg (2014). "Bioengineering virus-like particles as vaccines." Biotechnology and bioengineering **111**(3): 425-440.
37. Ludwig, C. & R. Wagner (2007). "Virus-like particles—universal molecular toolboxes." Current opinion in biotechnology **18**(6): 537-545.
38. Malashkevich, V. N., B. J. Schneider, M. L. McNally, M. A. Milhollen, J. X. Pang & P. S. Kim (1999). "Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-Å resolution." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(6): 2662-2667.
39. Manicassamy, B. & L. Rong (2009). "Expression of Ebolavirus glycoprotein on the target cells enhances viral entry." Virology journal **6**(1): 75.
40. Martinez, O., J. Johnson, B. Manicassamy, L. Rong, G. G. Olinger, L. E. Hensley & C. F. Basler (2010). "Zaire Ebola virus entry into human dendritic cells is insensitive to cathepsin L inhibition." Cellular microbiology **12**(2): 148-157.
41. Mascola, J. R. & B. F. Haynes (2013). "HIV-1 neutralizing antibodies: understanding nature's pathways." Immunological reviews **254**(1): 225-244.
42. McCarthy, S. E., J. M. Licata & R. N. Harty (2006). "A luciferase-based budding assay for Ebola virus." Journal of virological methods **137**(1): 115-119.
43. Mühlberger, E., M. Weik, V. E. Volchkov, H.-D. Klenk & S. Becker (1999). "Comparison of the transcription and replication strategies of Marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems." Journal of virology **73**(3): 2333-2342.

44. Nanbo, A., M. Imai, S. Watanabe, T. Noda, K. Takahashi, G. Neumann, P. Halfmann & Y. Kawaoka (2010). "Ebola virus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner." PLoS pathogens **6**(9): e1001121.
45. Nanbo, A., S. Watanabe, P. Halfmann & Y. Kawaoka (2013). "The spatio-temporal distribution dynamics of Ebola virus proteins and RNA in infected cells." Scientific reports **3**: 1206.
46. Ning, Y.-J., F. Deng, Z. Hu & H. Wang (2017). "The roles of ebola virus glycoproteins in viral pathogenesis." Virologica Sinica **32**(1): 3-15.
47. Nishimura, A., M. Morita, Y. Nishimura & Y. Sugino (1990). "A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells." Nucleic Acids Research **18**(20): 6169.
48. Noad, R. & P. Roy (2003). "Virus-like particles as immunogens." Trends Microbiol **11**(9): 438-444.
49. Noda, T., H. Sagara, E. Suzuki, A. Takada, H. Kida & Y. Kawaoka (2002). "Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP." Journal of virology **76**(10): 4855-4865.
50. Ntziora, F., D. Paraskevis, C. Haida, E. Manesis, G. Papatheodoridis, S. Manolakopoulos, I. Elefsiniotis, T. Karamitros, A. Vassilakis & A. Hatzakis (2013). "Ultrasensitive amplification refractory mutation system real-time PCR (ARMS RT-PCR) assay for detection of minority hepatitis B virus-resistant strains in the era of personalized medicine." Journal of clinical microbiology **51**(9): 2893-2900.
51. Papafragkou, E., J. Hewitt, G. W. Park, G. Greening & J. Vinje (2013). "Challenges of culturing human norovirus in three-dimensional organoid intestinal cell culture models." PloS one **8**(6): e63485.
52. Platt, E. J., M. Bilski, S. L. Kozak, D. Kabat & D. C. Montefiori (2009). "Evidence that ecotropic murine leukemia virus contamination in TZM-bl cells does not affect the outcome of neutralizing antibody assays with human immunodeficiency virus type 1." J Virol **83**(16): 8289-8292.
53. Platt, E. J., K. Wehrly, S. E. Kuhmann, B. Chesebro & D. Kabat (1998). "Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **72**(4): 2855-2864.
54. Puig-Basagoiti, F., T. S. Deas, P. Ren, M. Tilgner, D. M. Ferguson & P.-Y. Shi (2005). "High-throughput assays using a luciferase-expressing replicon, virus-like particles, and full-length virus for West Nile virus drug discovery." Antimicrobial agents and chemotherapy **49**(12): 4980-4988.
55. Qin, Z.-l., H.-p. Ju, Y. Liu, T.-t. Gao, W.-b. Wang, L. Aurelian, P. Zhao & Z.-t. Qi (2013). "Fetal bovine serum inhibits hepatitis C virus attachment to host cells." Journal of virological methods **193**(2): 261-269.
56. Qing, M., W. Liu, Z. Yuan, F. Gu & P. Y. Shi (2010). "A high-throughput assay using dengue-1 virus-like particles for drug discovery." Antiviral research **86**(2): 163-171.

57. Qiu, X., G. Wong, J. Audet, A. Bello, L. Fernando, J. B. Alimonti, H. Fausther-Bovendo, H. Wei, J. Aviles & E. Hiatt (2014). "Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp." Nature **514**(7520): 47.
58. Robbins, F. C., J. F. Enders & T. H. Weller (1950). "Cytopathogenic Effect of Poliomyelitis Viruses In vitro on Human Embryonic Tissues." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **75**(2): 370-374.
59. Rohovie, M. J., M. Nagasawa & J. R. Swartz (2017). "Virus-like particles: Next-generation nanoparticles for targeted therapeutic delivery." Bioengineering & translational medicine **2**(1): 43-57.
60. Sanchez, A., S. G. Trappier, U. Ströher, S. T. Nichol, M. D. Bowen & H. Feldmann (1998). "Variation in the glycoprotein and VP35 genes of Marburg virus strains." Virology **240**(1): 138-146.
61. Sasaki, M., P. D. Anindita, W. Phongphaew, M. Carr, S. Kobayashi, Y. Orba & H. Sawa (2018). "Development of a rapid and quantitative method for the analysis of viral entry and release using a NanoLuc luciferase complementation assay." Virus research **243**: 69-74.
62. Scherer, W. F., J. T. Syverton & G. O. Gey (1953). "Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses: IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix." Journal of Experimental Medicine **97**(5): 695-710.
63. Souf, S. (2016). "Recent advances in diagnostic testing for viral infections." Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research **9**.
64. Swenson, D. L., K. L. Warfield, K. Kuehl, T. Larsen, M. C. Hevey, A. Schmaljohn, S. Bavari & M. J. Aman (2004). "Generation of Marburg virus-like particles by co-expression of glycoprotein and matrix protein." Pathogens and Disease **40**(1): 27-31.
65. Takeuchi, Y., M. O. McClure & M. Pizzato (2008). "Identification of gammaretroviruses constitutively released from cell lines used for human immunodeficiency virus research." J Virol **82**(24): 12585-12588.
66. Valenzuela, P., A. Medina, W. J. Rutter, G. Ammerer & B. D. Hall (1982). "Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast." Nature **298**(5872): 347.
67. Van Weemen, B. & A. Schuurs (1971). "Immunoassay using antigen—enzyme conjugates." FEBS letters **15**(3): 232-236.
68. Warfield, K. L. & M. J. Aman (2011). "Advances in virus-like particle vaccines for filoviruses." The Journal of infectious diseases **204**(suppl\_3): S1053-S1059.
69. Wei, X., J. M. Decker, H. Liu, Z. Zhang, R. B. Arani, J. M. Kilby, M. S. Saag, X. Wu, G. M. Shaw & J. C. Kappes (2002). "Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy." Antimicrob Agents Chemother **46**(6): 1896-1905.
70. Weller, T. H. & J. F. Enders (1948). "Production of hemagglutinin by mumps and influenza A viruses in suspended cell tissue cultures." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **69**(1): 124-128.

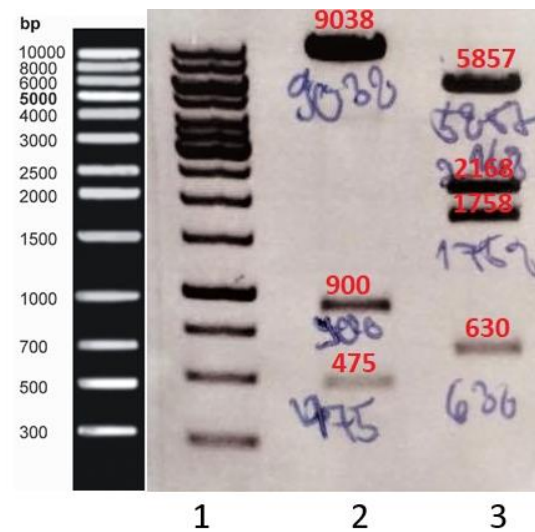
71. Wiley, D. C., J. J. Skehel & M. Waterfield (1977). "Evidence from studies with a cross-linking reagent that the haemagglutinin of influenza virus is a trimer." Virology **79**(2): 446-448.
72. Yu, D.-S., T.-H. Weng, X.-X. Wu, F. X. Wang, X.-Y. Lu, H.-B. Wu, N.-P. Wu, L.-J. Li & H.-P. Yao (2017). "The lifecycle of the Ebola virus in host cells." Oncotarget **8**(33): 55750.
73. Zeltins, A. (2013). "Construction and characterization of virus-like particles: a review." Mol Biotechnol **53**(1): 92-107.

## KASUTATUD VEEBILEHED

1. *Ebola outbreak 2014-2015*. (Kuupäev puudub). World Health Organization. Loetud aadressil: <http://www.who.int/csr/disease/ebola/en/>
2. *Ebola virus disease*. (2018). World Health Organization. Loetud aadressil: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ebola-virus-disease>

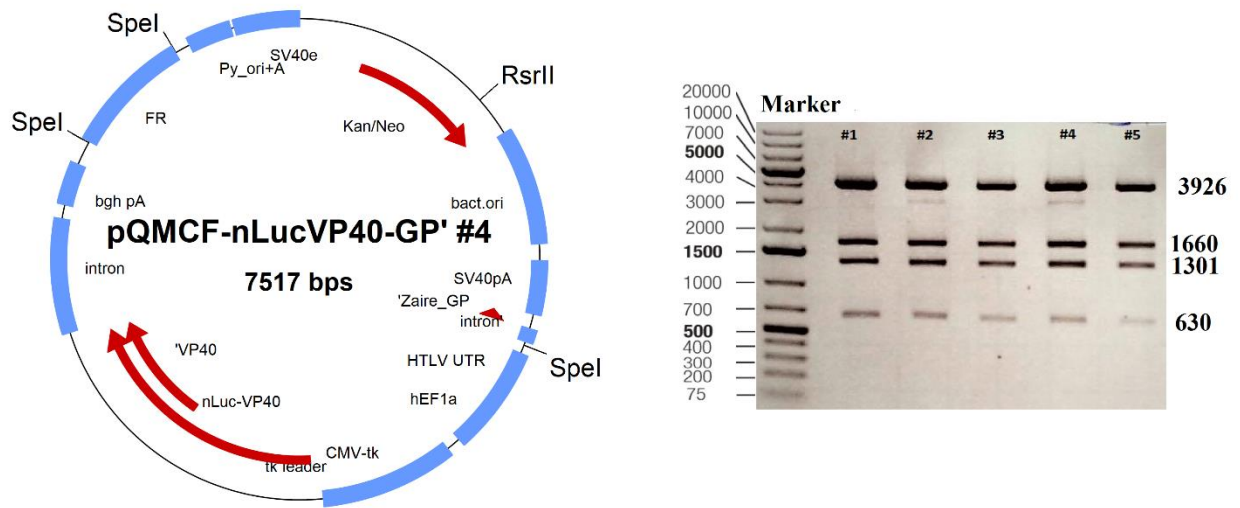
# LISAD

**Lisa 1. pQMCF-nanolucVP40-GP #2 plasmidi kontroll restriksioonanalüüsiga**



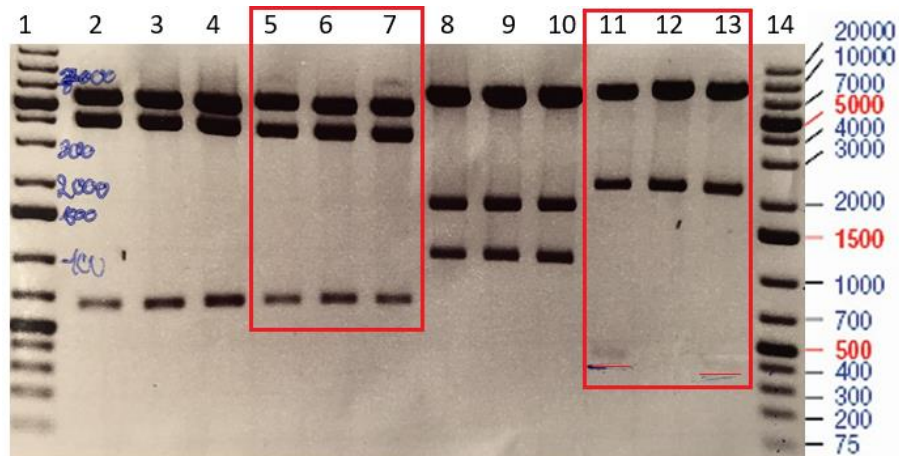
Märkused: pQMCF-nanolucVP40-GP plasmidi kontroll kahe erineva restriктаasi kombinatsiooniga. **1** – 1kb suurusmarker (Thermo Fisher Scientific). **2**- Restriksioon Eco91I ning Bsp119I restriктаasidega. **3**- Restriksioon restriктаasidega Eam1105I ning SpeI.

## Lisa 2. pQMCF-nLucVP40-GP' #4 plasmidi kontroll restriksioonanalüüsiga



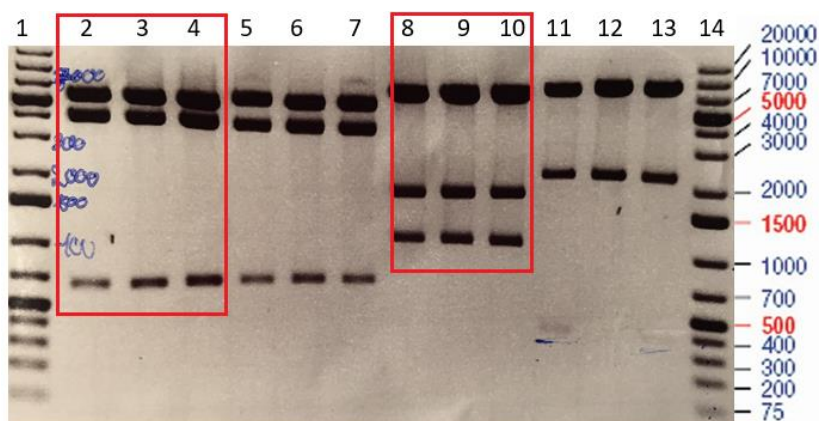
Märkused: pQMCF-nLucVP40-GP' #4 plasmiidide kontroll restriksiooniensüümidega RsrII ja SpeI.

### Lisa 3. pQMCF-nLucVP40-ConBtrenv plasmidi kontroll restriksioonanalüüsiga



Märkused: pQMCF-nLucVP40-ConBtrenv plasmidi kontroll restriksioonanalüüsiga. Radadel 5, 6 ja 7 näha restriksiooni ensüümiga SpeI, mille tulemusel tekkisid fragmendid suurusega 6065, 3926 ja 630 bp. Radadel 11, 12 ja 13 näha restriksiooni ensüümidega Bsp119I ja DraIII, mille tulemusel tekkisid fragmendid 8059, 2189 ja 373 bp. Foresil kasutati 1 kb plus suurus markerit (Thermo Fisher Scientific).

#### Lisa 4. pQMCF-nLucVP40-HA5 plasmidi kontroll restriksioonanalüüsiga



Märkused: pQMCF-nLucVP40-HA5 plasmidi kontroll restriksiooniga. Radadel 2, 3 ja 4 näha restriksiooni ensüümiga SpeI, mille tulemusel tekkisid fragmendid suurusega 5531, 3926 ja 630 bp. Radadel 8, 9 ja 10 näha restriksiooni ensüümidega MluI ja DraIII, mille tulemusel tekkisid fragmendid suurusega 7245, 1788 ja 1054 bp. Foreesil kasutati 1 kb plus markerit (Thermo Fisher Scientific).



# LIHTLITSENTS

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Gabriel Agur (sünnikuupäev: 24.02.1994),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Meetod viirusnakkuse inhibiitorite leidmiseks ja kirjeldamiseks nanolutsiferaasi aktiivsusega viiruslaadsete partiklite abil“, mille juhendajad on Mart Ustav, Ph.D. ja Andres Männik, Ph.D,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **28.05.2018**